

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

**Alfaviiruste RNA sünteesiks vajalike determinantide uurimine matriits-RNAde ja
replikaaside kombinatsioonide abil**

Magistritöö
30 EAP

Laura Sandra Lello

Juhendajad: PhD Age Utt
Prof. Andres Merits

TARTU 2020

INFOLEHT

Alfaviirused on *Togaviridae* sugukonda kuuluv arboviiruste perekond. Alfaviiruste genoom sisaldab kahte avatud lugemisraami, millest esimene kodeerib mittestruktuurseid ning teine struktuurseid valke. Mittestruktuurset regioonilt sünteesitakse replikaasi eellane – mittestruktuurne liitvalk, mis enne funktsionaalsuse saavutamist läbib proteolüütilise töötlemise. Alfaviiruste replikaas osaleb RNA replikatsioonil olulistes interaktsioonides *cis*-elementidega genoomi otstes ning lugemisraamide vahelises alas. Käesolevas magistritöös kasutati usaldusväärset *trans*-replikatsiooni süsteemi uurimaks üheksa alfaviiruse näitel replikatsiooniks vajalike determinantide paiknemist genoomis. RNA matriitside ning replikaaside kombineerimise teel tehti kindlaks, et SFV kompleksi kuuluvad replikaasid replitseerivad ning transkribeerivad efektiivselt nii SFV kompleksi kuuluvate kui ka kompleksi välisete viiruste RNA matriitse. Samas, kompleksi väliste viiruste replikaaside käitumine oli spetsiifilisem. Sindbis viiruse/Chikungunya viiruse hübriitsete matriitside abil tehti kindlaks, et replikatsiooni ja transkriptsiooni viirus-spetsiifilisuseks vajalikud determinandid paiknevad vastavalt genoomi 5' UTR esimeses juuksenõelastruktuuris (SL3) ja subgenoomse promootori regioonis.

Märksõnad: alfaviirused, replikaas, matriits-RNA, *trans*-replikatsiooni süsteem, 5'UTR. Lõputöö CERCS kood on B230.

Alphaviruses are arboviruses, belonging to the family *Togaviridae*. The genome of alphaviruses consists of two open-reading frames, the first of which encodes the nonstructural and the second the structural polyprotein. The nonstructural region is directly translated as an early replicase polyprotein. Before reaching its functionality, the alphavirus replicase is proteolytically processed. During replication, the replicase interacts with *cis*-active sequences at the ends of the genome and intergenic region of the genome. In this thesis, nine alphaviruses were studied using the *trans*-replication system. Using a “mix and match” strategy, it was confirmed that alphavirus replicases belonging to the SFV complex can effectively replicate and transcribe the template RNAs belonging to the same complex and also to outgroup viruses, whereas the replicases of outgroup viruses demonstrate a more specific pattern. Using Sindbis virus/Chikungunya virus hybrid templates, it was discovered that the determinants necessary for effective replication and transcription belong to the extreme end of 5' UTR (SL3) and subgenomic promoter region.

Keywords: alphaviruses, replicase, template RNA, *trans*-replication system, 5' UTR. Research CERCS code is B230.

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 ALFAVIIRUSED	8
1.1.1 ÜLDISELOOMUSTUS	8
1.1.2 ALFAVIIRUSTE VIRION	9
1.1.3 GENOOMI ORGANISATSIOON	9
1.1.4 STRUKTUURSED VALGUD	11
1.1.5. MITTESTRUKTUURSED VALGUD	12
1.2. INFEKTSIOONITSÜKKEL	14
1.2.1. VIIRUSE SISENEMINE RAKKU	14
1.2.2. RNA REPLIKATSIOON	15
1.2.3. VIRIONIDE MOODUSTUMINE NING VABANEMINE	16
1.3. TÖÖS KASUTATUD VIIRUSED	17
1.3.1. SEMLIKI KOMPLEKSI VIIRUSED	18
1.3.2. VÄLISGRUPI VIIRUSED	19
1.4. <i>TRANS</i> -REPLIKATSIOONI SÜSTEEM.....	20
1.4.1. NÄITEID <i>TRANS</i> -REPLIKATSIOONI SÜSTEEMI KASUTAMISEST SFV NING CHIKV UURIMISEL IMETAJARAKKUKES	21
1.4.2. NÄITEID <i>TRANS</i> -REPLIKATSIOONI SÜSTEEMI KASUTAMISEST CHIKV UURIMISEL PUTUKARAKKUKES	23
1.4.3. RNA POLÜMERAAS I PÕHINE <i>TRANS</i> -REPLIKATSIOONI SÜSTEEM ...	23
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	25
2.1. TÖÖ EESMÄRGID.....	25
2.2. MATERJAL JA METOODIKA.....	26

2.2.1. PLASMIIDIDE KONSTRUEERIMINE: MATRIITS-RNA EKSPRESSIOONIPLASMIIDID	26
2.2.2. PLASMIIDIDE KONSTRUEERIMINE: REPLIKAASI EKSPRESSIOONI- PLASMIIDID	29
2.2.3. REKOMBINANTSETE DNAd VALMISTAMINE	30
2.2.4. EKSPERIMENTIDE LÄBI VIIMINE KOEKULTUURIS.....	31
2.3. TULEMUSED JA ARUTELU	34
2.3.1. ALFAVIIRUSTE <i>TRANS</i> -REPLIKAASIDE AKTIIVSUSEID INIMESE RAKKUDES SAAB HINNATE MARKERVALKUDE AKTIIVSUSTE ABIL.....	35
2.3.2. ALFAVIIRUSTE <i>TRANS</i> -REPLIKAASIDE AKTIIVSUSED <i>AEDES</i> <i>ALBOPICTUS</i> RAKKUDES ON VÄIKSEMAD KUI INIMESE RAKKUDES	37
2.3.3. SFV KOMPLEKSI KUULUVATE VIIRUSTE REPLIKAASID ON INIMESE RAKKUDES VÕIMELISED EFEKTIIVSELT RISTKASUTAMA KOMPLEKSI KUULUVATE JA KOMPLEKSI VÄLISTE VIIRUSTE MATRIITS-RNAsid	40
2.3.4. ALFAVIIRUSTE MATRIITSIDE RISTKASUTAMINE <i>AEDES ALBOPICTUS</i> RAKKUDES SARNENE NENDE RISTKASUTAMISELE INIMESE RAKKUDES	47
2.3.5. ALFAVIIRUSTE MATRIITSIDE VIIRUS-SPETSIIFILISUS TULENEB GENOOMI 5' NING SG REGIOONIDEST.....	53
2.3.6. SINV MATRIITSI EFEKTIIVSE REPLIKATSIOONI JAOKS VAJALIKUD JÄRJESTUSED PAIKNEVAD 5' REGIOONI ALGUSES	58
KOKKUVÕTE	60
SUMMARY	61
KASUTATUD KIRJANDUS	62
KASUTATUD VEEBIAADRESSID	70
LISAD	72
LIHTLITSENTS	119

KASUTATUD LÜHENDID

BFV – *Barmah Forest virus*, Barmah Forest viirus

C6/36 – *Aedes albopictus* (Aasia tiigersääsk) rakud

CHIKV – *Chikungunya virus*, Chikungunya viirus

CMV – tsütomegaloviirus

CP – *capsid protein*, kapsiidivalk

CSE – *conserved sequence element*, konserveerunud järjestuse element

DIG - dioksügeen

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

dsRNA – kaheaheelaline RNA

EEEV – *Eastern equine encephalitis virus*, Ida hobuste entsefaliidi viirus

EGFP – *enhanced green fluorescent protein*, roheliselt fluorestseeruv valk

EILV – *Eilat virus*, Eilat viirus

FCS – *fetal calf serum*, vasika loote serum

Fluc – *firefly* lutsiferaas, jaanimardika lutsiferaas

FZsG – *Firefly-ZsGreen*

Gluc – *Gaussia* lutsiferaas

HEK293 – inimese embrüonaalsed neerurakud

IMDM – *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

IRES – *internal ribosome entry site*, sisemine ribosoomi seondumissait

MAYV – *Mayaro virus*, Mayaro viirus

nsP1-4 – *non-structural proteins 1-4*, mittestruktuursed valgud 1-4

nt - nukleotiidijääk

ONNV – *O'nyong-nyong virus*, O'Nyong-Nyong viirus

RdRp – RNA-sõltuv RNAPolümeraas

Rluc – *Renilla* lutsiferaas

RRV – *Ross River virus*, Ross River viirus

RTPaas – *RNA triphosphatase*, RNA trifosfataas

SARS-CoV-2 - *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

SFV – *Semliki Forest virus*, Semliki Forest viirus

SG – subgenoomne

SINV – *Sindbis virus*, Sindbis viirus

ssRNA – üheaahelaline RNA

TF – *transframe* valk

U2OS – inimese luu osteosarkoomi epiteelkoe rakud

ubi – ubikvitiin

UTR – *untranslated region*, mittetransleeritav regioon

VEEV - *Venezuelan equine encephalitis virus*, Venezuela hobuste entsefaliidi viirus

ZsG – *ZsGreen*

3'R – 3' regioon

5'R – 5' regioon

SISSEJUHATUS

Viirused on bioloogilised objektid, mis paiknevad elusa ning elutu looduse piirimail. Viirustele on omane RNA või DNA genoom, mis on pakitud valgulisse kapsiidi. Kapsiidi võib omakorda katta lipiidne ümbris. Viirustel puudub rakuline ehitus ning võime iseseisvalt paljuneda, mistõttu vajavad selleks nad peremeesraku abi. Seetõttu kutsutakse viiruseid ka obligatoorseks endoparasiitideks.

Viirused on äärmiselt mitmekesised, suutes nakatada kõiki elusorganisme. Paljud viirusnakkused kulgevad sageli sümptomiteta. Siiski on ka viiruseid, mille infektsiooni tagajärjel tekib tõsisemaid organismi talitluse häireid. Üks sellistest on hetkel maailmas kõrget tähelepanu pälvinud SARS-CoV-2 (*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, sugukond *Coronaviridae*), millele puuduvad veel nii vaktsiinid kui ka viirusvastased vahendid. 3. august 2020 seisuga on SARS-CoV-2 nakatunud maailmas üle 18 miljoni ning surnud üle 600 tuhande (Johns Hopkinsi Ülikool, 2020). Nagu enamuse hiljuti epideemiaid põhjustanud viiruseid, on SARS-CoV-2 tekkinud peremees-organismide vahetamise ja võib-olla ka viiruste vahelise rekombinatsiooni tulemusena. Sama kehtib ka epideemiaid põhjustavate alfaviiruste kohta, millele sarnaselt SARS-CoV-2le vaktsiinid puuduvad. Alfaviiruste uurimisega tegeleb Eestis RNA viiruste uurimisrühm Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis. Tehnoloogiainstituudi RNA viiruste uurimisrühmas on valminud ka käesolev magistritöö.

Alfaviirused (*Togaviridae*) on viiruste perekond, kuhu kuulub ~30 teadaolevat esindajat. Neile on omane positiivse polaarsusega RNA genoom ning suhteliselt väikesed virionid. Alfaviirused levivad enamasti putukvektorite vahendusel nakatades nii imetajaid, linde kui ka kalu. Alfaviiruste hulgas esineb mitmeid olulisi inimeste ning loomade patogeene, näiteks Chikungunya viirus. Käesolevas magistritöös on keskendutud alfaviiruste RNA replikatsiooni uurimisele *trans*-replikatsiooni süsteemi abil. Töö eesmärkide hulka kuulus testsüsteemi arendamine eesmärgiga viia läbi suuremahuline matriitside ristikasutamise uurimine. Selleks teostati RNA ekspressiooniplasmiidide konstrueerimine ning kasutati neid alfaviiruste replikatsiooni jaoks vajalike determinantide määramisel matriits-RNAdel.

Töö on valminud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi ning Antwerpeni Troopilise Meditsiini instituudi koostööprojekti raames. Täna oma juhendaid professor Andres Meritsat ning doktor Age Utti juhendamise ning heade nõuannete eest. Lisaks soovin tänada juhendamise ning meeldiva koostöö eest professor Kevin Ariëni ning doktor Koen Bartholomeeuseni Antwerpeni Troopilise Meditsiini Instituudist.

KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 ALFAVIIRUSED

1.1.1 ÜLDISELOOMUSTUS

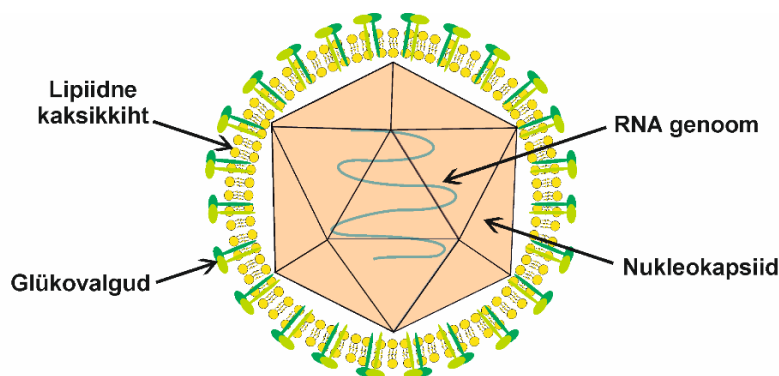
Alfaviirused on *Togaviridae* sugukonda kuuluv positiivse RNA genoomiga viiruste perekond. Mitmed alfaviirused on meditsiiniliselt olulised põhjustades inimestel sümptomeid nagu näiteks palavik, lööve ning liigeste vaegused. Osa alfaviiruseid põhjustavad aga entsefaliiti. Enamik alfaviiruseid on arboviirused ning levivad lüljalgsete vahendusel, kasutades peamiselt vektoritena *Aedes* ja *Culex* perekondadesse kuuluvaid sääski. Vektorid jäävad seejuures infektsioonist minimaalselt mõjutatuks (Pietilä *et al.*, 2017; Strauss ja Strauss, 1994). Eranditeks on Lõhede pankrease haiguse viirus (*Salmon pancreas disease virus*) ning Lõuna lonthüljeste viirus (*South elephant seal virus*), mis teadaolevalt vektoreid ei kasuta (ICTV, 2019). Osa alfaviiruseid nakatab ainult sääski ja neil puuduvad selgroogsed peremehed. Esimeseks selliseks alfaviiruseks oli Eilat viirus (EILV) (ICTV, 2019).

Alfaviirused on maailmas laialdaselt levinud, olles esindatud kõikidel mandritel peale Antarktika. Ajalooliselt on alfaviiruste levik olnud piiratud erinevate keskkonnabarjäärade ning viiruste vektor-spetsiifilisuse tõttu. Viimastel aastakümnetel on aga kliima soojenemine ning üleilmastumine lihtsustanud oluliselt putukvektorite levikut uutele aladele. Näiteks on alfaviiruste hulka kuuluv Chikungunya viirus (CHIKV) viimase 20 aasta jooksul põhjustanud mitmeid epideemiaid eri paikades üle terve maailma. Maailma Tervise Organisatsiooni andmetel leidis 2005 ja 2006 aastatel aset Mauritiuse ja Reunioni saartel CHIKV epideemia, mille tõttu haigestus üle 270 000 inimese. Lisaks toimus 2006. aastal CHIKV puhang ka Indias, kus registreeriti rohkem kui 1,5 miljonit CHIKV nakatunut (WHO, 2019). 2006-2013 aastatel tuvastati USAs keskmiselt 28 nakatunut aastas, kusjuures, kõik nakatunud olid hiljuti külastanud Aasiat, Aafrikat või India Ookeani saari. 2013. aastal tuvastati esimene CHIKV ülekandumine moskiitolt inimesele Kariibi mere territooriumitel, millele järgnes viiruse laialdane levik Lääne-Ameerikas (CDC, 2020).

Arboviiruste hulka kuuluvad alfaviirused jagunevad Uue ning Vana Maailma viirusteks. Uue Maailma alfaviirused põhjustavad eelkõige entsefaliiti ning nende hulka kuuluvad näiteks Venezuela hobuste entsefaliidi viirus (VEEV, *Venezuelan equine encephalitis virus*) ning ka Ida hobuste entsefaliidi viirus (EEEV, *Eastern equine encephalitis virus*). Vana Maailma alfaviirused on vähem neurovirulentsed ning põhjustavad peamiselt palavikku, löövet ning artriiti. Vana Maailma alfaviiruste hulka kuuluvad näiteks CHIKV, Sindbis viirus (SINV), Ross River viirus (RRV), Semliki Forest viirus (SFV), O'Nyong-Nyong viirus (ONNV), Barmah Forest viirus (BFV) ning Mayaro viirus (MAYV) (Jose *et al.*, 2009).

1.1.2 ALFAVIIRUSTE VIRION

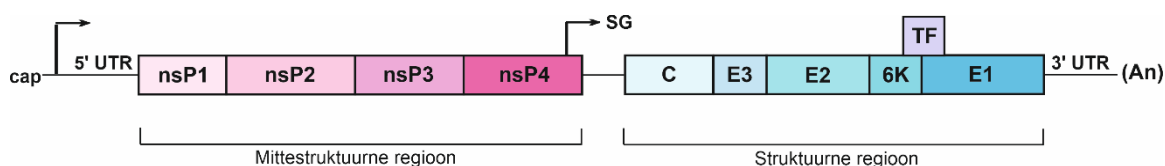
Alfaviiruste genoom on kapsiidivalkude abil pakitud T=4 sümmeetriaga ikosaeedriliseks nukleokapsiidiks (Joonis 1). Nukleokapsiidi katab peremeesorganismi päritolu lipiidne ümbris, kuhu on kinnitunud viiruse glükovaigud E1 ning E2. E1 ning E2 valgud moodustavad stabiilsed heterodimeerid, mis omakorda ühinevad virioni pinnal trimeerseteks ogataolisteks struktuurideks (Jose *et al.*, 2009). 240 E1:E2 heterodimeeri moodustavad kokku 80 ogastruktuuri. Virioni läbimõõt on ligikaudu 70 nm (Strauss ja Strauss, 1994).



Joonis 1. Skemaatiline ülevaade alfaviiruste virioni struktuurist. Sinine – RNA genoom; oranž – nukleokapsiid; kollane – lipiidne membraan; roheline – E1:E2 heterodimeerid.

1.1.3 GENOOMI ORGANISATSIOON

Alfaviiruste genoom on umbes 12 kb pikkune üheaahelaline positiivne RNA (Joonis 2). Genoomi 5' otsas on 7-metüülguanosiini *cap*-struktuur ning 3' otsas polüadenüleeritud saba. 5' *cap*-struktuur on vajalik viiruse mittestrukturese polüproteiini translatatsiooniks ning samuti RNA kaitseks nukleasidest (Feibelman *et al.*, 2018). Genoomi kodeeriv ala jaguneb kaheks avatud lugemisraamiks (ORF, *open-reading frame*), millest 5' otsa poolne ORF kodeerib mittestruktureseid (ns, *non-structural*) valke ning 3' otsa poolne ORF struktureseid valke. Mõlemad lugemisraamid transleeritakse liitvalguna. Nii mittestrukturese P1234 kui ka strukturese C-E3-E2-6K-E1 liitvalk läbivad peale translatiooni põhjaliku töötuse, mille järel moodustuvad iseseisvad ns ning strukturesed valgud. P1234 liitvalgu töötus on vajalik funktsionaalse replikatsioonikompleksi moodustamiseks (Jose *et al.*, 2009; Strauss ja Strauss, 1994).

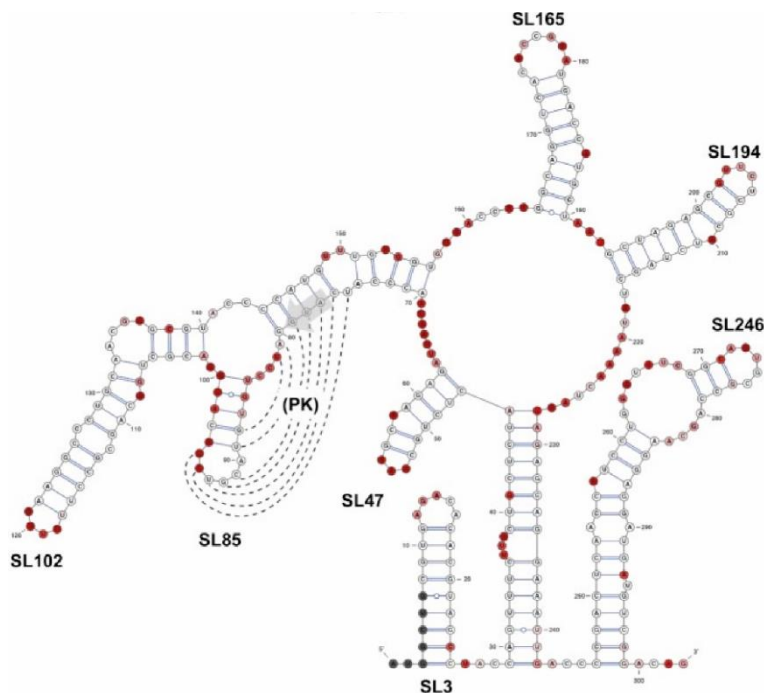


Joonis 2. Alfaviiruste genoomi organisatsioon. Genoomi 5' otsas on *cap*-struktuur. Esimene ORF (roosad toonid) on ns regioon, millele järgneb subgenoomne promootor ning geenide vaheline mittekodeeriv RNA. Teine

ORF (sinised toonid) on struktuurne regioon. Genoomi 3' otsas on polüadenüleeritud saba; cap – cap-struktuur; 5' UTR – 5' mittetransleeritav regioon; nsP1-4 – mittestruktuursed valgud 1-4; SG – subgenoomne promootor; C – kapsiidivalk; E1-3 – glükovaigud; 6K – väike membraanseoseline valk; TF – *transframe* valk; 3' UTR – 3' mittetransleeritav regioon; A_n – polüadenüleeritud saba. Nooded tähistavad genoomse ja SG RNAd sünteesi alguskohti. Joonis on skemaatiline ning ei vasta reaalsele mõõtkavale.

Alfaviiruste genoomis on kolm mittetransleeritavat regiooni (UTR, *untranslated region*). Esimene neist on 5'UTR, mis asub genoomi 5' otsas ning on 27-85 nukleotiidijäägi (nt) pikkune. Teine UTR paikneb kahe kodeeriva regiooni vahel ja on umbes 50 nt pikkune. Kolmas mittetransleeritav regioon on 3' UTR, mille pikkus jääb 87-896 nt vahele. Kõik kolm UTRi on olulised viiruse genoomi replikatsioonil ning valkude ekspressioonil ja ka viiruse ja peremehe vahelistes interaktsioonides (Frolov *et al.*, 2001; Hyde *et al.*, 2015; Stapleford *et al.*, 2016). Alfaviiruste genoomis on leitud neli *cis*-aktiivset konserveerunud järjestuse elementi (CSE, *conserved sequence element*), millest kaks paiknevad UTRdes (Frolov *et al.*, 2001; Hyde *et al.*, 2015, 2015; Kuhn *et al.*, 1990; Strauss ja Strauss, 1994). Esimene CSE paikneb genoomi 5' otsas ning on 44 nt pikkune. Sellele järgneb 51 nt CSE, mis asub nsP1 kodeerivas järjestuses ning on hädavajalik viiruse replikatsiooniks moskiitodes, kuid mitte imetajarakkudes (Fayzulin ja Frolov, 2004). Antud CSE sisaldab kahte lühikest juuksenõelaststruktuuri (SL, *stemloop*) (Niesters ja Strauss, 1990). Kolmas CSE on 21 nt pikkune ning kattub nsP4 valgu C-terminaalset osa kodeeriva järjestusega. 21 nt CSE tähistab negatiivsel RNA ahelal SG RNA transkriptsiooni initsiatsiooni saiti (Ou *et al.*, 1982). Viimane CSE, pikkusega 19-24 nt, paikneb vahetult enne polü-A-saba algust genoomi 3' otsas (Hyde *et al.*, 2015; Strauss ja Strauss, 1994). 3' otsa 19 nt CSE on osa põhilisest promootorist, mis on oluline RNA negatiivse ahela sünteesiks (Kuhn *et al.*, 1990).

Alfaviiruste RNA 5' otsa teise-astme (ruumiline) struktuur sai hiljuti ka katseliselt kinnitatud (Kendall *et al.*, 2019). CHIKV genoomi 5' otsa 318 nt pikkuses regioonis leiti kokku seitse SL struktuuri (Joonis 3). Tuvastatud SL struktuurid nimetati vastavalt sellele mitmendast nukleotiidist genoomi 5' otsast lugedes nad algavad. Osa neist struktuuridest on genoomi replikatsioonil alati vajalikud, samas kui osad on olulised vaid peremehe tüübi (selgroogne või sääsk) spetsiifiliselt – ainult SL47 oli absoluutselt vajalik tõhusa replikatsiooni toimumiseks nii imetaja- kui ka vektorputukarakkudes (Kendall *et al.*, 2019).



Joonis 3. CHIKV genoomi 5' otsa struktuur. SL – juuksenõelastruktuur; SL numbrid näitavad mitmest nukleotiidist genoomi 5' otsast lugedes SL struktuur algab. Joonis pärineb (Kendall *et al.*, 2019).

1.1.4 STRUKTUURSED VALGUD

Alfaviiruste genoomi struktuurne ala transkribeeritakse subgenoomse, 26S mRNA-na, millelt transleeritakse C-E3-E2-6K-E1 polüproteiin. Struktuurne liitvalk läbib seejärel rea lõikamisi, mille tagajärjel vabanevad virioni ümbrise valgud E1 ja E2, kapsiidi valk (CP, *capsid protein*) ning väiksemad valgud 6K ja E3 (Strauss ja Strauss, 1994).

CP paikneb struktuurse liitvalgu N-terminaalses osas. CP vabaneb liitvalgust tänu oma seriinproteaasile *cis*-aktiivsusele ning selle voltumine toimub nii ko- kui ka posttranslatsiooniliselt. (Hahn *et al.*, 1985). SINV CP koosneb 264 aminohappejäägist ning on massiga ~30 kDa (Mendes ja Kuhn, 2018). CP seondub viiruse genoomse RNAGA ning on vajalik nukleokapsiidi moodustamiseks (Weiss *et al.*, 1989).

Glükovaigud E1 ja E2 moodustavad heterodimeeri, mis trimeerideks liitudes annavad viiruspartikli pinnal paikneva ogastruktuuri. Selliseid ogastruktuure on virioni pinnal 80 (Strauss ja Strauss, 1994). E1 ja E2 glükovaikudele on omane transmembraanne heeliksi domeen, mis läbib virioni lipiidset membraani. E1 sisaldab nn sulandumispeptiidi, mis on oluline virioni ümbrise liitumiseks peremehe endosomaalse membraaniga (Jose *et al.*, 2009; Strauss ja Strauss, 1994). Enne viiruspartiklite vabanemist, lõigatakse E2 ja E3 eelvalk (p62) valmis valkudeks (Wahlberg *et al.*, 1992). E2 valk vastutab peamiselt rakuliste retseptoritega seondumise eest (Byrnes ja Griffin, 1998). E3 glükovaik jääb teatud juhtudel (SFV) seotuks virioniga, kuid on ka viiruseid, mille puhul E3 seotuks ei jää (SINV) (Strauss ja Strauss, 1994).

Lisaks glükovalkudele pakitakse virioni veel ka muid membraanseoselisi valke. 6K valk on väike, 6000 Da molekulmassiga polüpeptiid, mis on viiruspartiklis oluliseks struktuurseks komponendiks. On näidatud, et mutatsioonide lisamine viiruse genoomi 6K regiooni viib infektsioonilisuse vähenemiseni. 6K valku kodeeriva regiooni eemaldamine ei põhjusta muutusi teiste struktuursete valkude sünteesil ega pakkumisel, kuid vähendab oluliselt uute viiruspartiklite vabastamist (Liljeström *et al.*, 1991). 6K regioonilt kodeeritakse raaminihke tulemusel veel ka TF (*transframe*) valku (Firth *et al.*, 2008).

1.1.5. MITTESTRUKTUURSED VALGUD

Alfaviiruse genoomi mittestruktuurset regioonilt kodeeritakse replikatsioonil osalevaid ns valke. P1234 polüproteiin transleeritakse otse genoomselt RNAlt, misjärel mitmete lõikamiste tulemusel moodustub neli iseseisvat replikatsiooniks vajalikku valku (nsP1-4). Infektsiooni käigus on vajalikud nii P1234 polüproteiin, selle lõikamise vaheproduktid kui ka üksikud mittestruktuurset valgud. Ns valgud on olulised nii viiruse genoomi replikatsioonil kui ka SG RNA transkriptsioonil (Pietilä *et al.*, 2017; Strauss ja Strauss, 1994).

nsP1 käitub viiruse genoomsele ja SG RNAle *cap*-struktuuri lisamisel metüül- ja guanüülültransferaasina (Ahola ja Kääriäinen, 1995; Laakkonen *et al.*, 1994). Alfaviiruste positiivse RNA ahela süntees toimub replikatsioonikompleksides (RC, *replication complex*), mis asuvad membraansetes sissesopitsustes. Selliseid sopistusi kutsutakse ka sfääruliteks. On näidatud, et nsP1 on ainus ns valk, mis otse membraaniga seondub, käitudes RC jaoks ankruna (Salonen *et al.*, 2003). nsP1 on palmitüleeritud ning tugevalt seotud plasmamembraani tsütoplasmaatilise poolega. Mitte-palmitüleeritud nsP1 mutantide puhul on täheldatud nsP1 ning membraani vahelise seondumise nõrgenemist (Laakkonen *et al.*, 1996; Peränen *et al.*, 1995). Seondumise nõrgenemisel mõned alfaviirused (SINV) säilitavad infektsioonilisuse, teised (CHIKV) aga mitte. nsP1 kannab olulist rolli ka negatiivse RNA sünteesimisel. RNA negatiivse ahela sünteesil nsP1 seondub nsP4 valguga nii P123 polüproteiini ning ilmselt ka nsP1 + P23 valkude kujul (Lulla *et al.*, 2008; Shirako *et al.*, 2000).

nsP2 on multifunktsionaalne valk, mis on vajalik RNA replikatsioonil ning ns liitvalgu töötlemisel. nsP2 C-terminaalses regioonis paikneb papaiin-tüüpi proteaasi domeen, mis annab valgule proteolüütilise aktiivsuse (Hardy ja Strauss, 1989). nsP2 N-terminaalne osa on alfaviiruste seas kõrgelt konserveerunud ning seda piirkonda seostatakse valgu helikaasse ning RTPaasse funktsiooniga (Das *et al.*, 2014; Law *et al.*, 2019).

nsP3 valk jaguneb kolmeks domeeniks: N-terminaalne makrodomeen, tsinki siduv keskmine domeen (ZBD, *Zinc-Binding Domain*) ning C-terminaalne hüpervariaabel-domeen (HVD, *Hypervariable domain*). Makrodomeen, mida nimetatakse ka X domeeniks, on kõrgelt

konserveerunud alfaviiruste, koroonaviiruste, hepatiit E viiruse ning rubella viiruse seas (Gorbalenya *et al.*, 1991). nsP3 keskmine, alfaviirustele unikaalne domeen on tsinki siduva aktiivsusega. ZBD arvatakse oluline olevat replikatsioonil, kuid selle täpne funktsioon on veel teadmata (Shin *et al.*, 2012). Kolmas nsP3 valgu domeen on HVD domeen. HVDd iseloomustab suur varieeruvus nii järjestuses kui ka pikkuses, lisaks on talle omane vähene keerukus ning teadaolevalt puuduvad ka suured sekundaarstruktuurid (Strauss *et al.*, 1988). HDV regioonile seonduvad mitmed viiruse replikatsiooniks vajalikud raku valgud (Meshram *et al.*, 2018; Mutso *et al.*, 2018; Panas *et al.*, 2012).

nsP4 on alfaviiruste RNA-sõltuv RNA polümeraas (RdRp, *RNA-dependent RNA polümerase*). nsP4 on alfaviiruste valkude seas kõige rohkem konserveerunud – erinevatesse kompleksidesse kuuluvate CHIKV ja BFV nsP4 valgud on identsed 71% ning samasse kompleksi kuuluvate CHIKV ning ONNV nsP4 valgud isegi 91% ulatuses (Khan *et al.*, 2002). nsP4 pikkus on ~600 aminohappejääki ning talle on iseloomulik suurem C-terminaalne domeen, mis jagab sarnasusi teiste viraalsete RdRp-dega ning väiksem, ~150 aminohappejäägi pikkune N-terminaalne domeen, mis on iseloomulik ainult alfaviirustele. N-terminaalne domeen on replikatsiooniks hädavajalik ning sellel võib puududa kõrgema astme struktuurne organisatsioon. Teadaolevalt osaleb N-terminaalne domeen interaktsioonides teiste valkudega RCs (Rupp *et al.*, 2011). nsP4 C-terminaalses osas asub RNA polümeraasidele omane GDD (Gly-Asp-Asp) motiiv (Kamer ja Argos, 1984).

nsP4 kogus nakatunud rakus on rangelt kontrollitud. Vahetult enne nsP4 järjestuse algust asub enamikel alfaviirustel opaalne (UGA) terminatsioonikoodon, mistõttu transleeritakse replikatsioonitsükli alguses kahte ns polüproteiini – valdavas enamuses P123 liitvalku ning väiksemas mahu, opaalkoodonist üle lugedes, ka P1234 polüproteiini. Terminatsioonikoodonist üle lugemine toimub kõigest 10-20% efektiivsusega ning kuna nsP4 vabaneb ainult P1234 protsessimise käigus, on seda rakus teistest ns valkudest oluliselt vähem (Strauss *et al.*, 1983). Teine nsP4 vähesuse põhjus on valgu N-terminaalse osa alguses asuv türosiini jääk, mis käitub destabiliseerivalt ning põhjustab rakus vaba nsP4 lagundamist (de Groot *et al.*, 1991). N-terminuse alguses asuv türosiini jääk on oluline nsP4 ning nsP1 interaktsiooniks, mis omakorda on hädavajalik negatiivse RNA ahela sünteesil. Türosiini jäägi asendamine mõne mittearomaatse aminohappejäägiga segab nsP4 ning nsP1 interaktsioone ning läbi selle negatiivse ahela sünteesi (Shirako ja Strauss, 1998). Kuigi nsP4 on alfaviiruste RdRp, on replikatsiooni toimumiseks siiski vaja kõiki mittestruktuurseid valke.

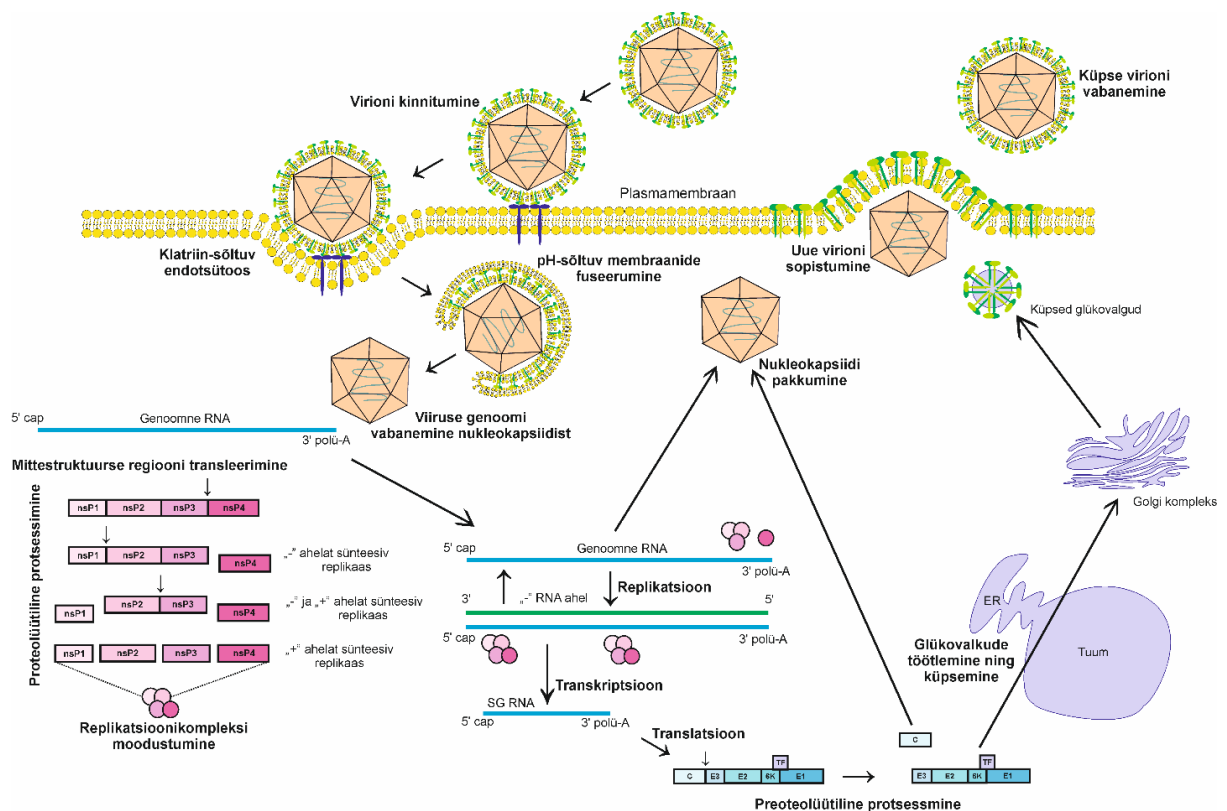
1.2. INFEKTSIOONITSÜKKEL

Alfaviiruste elutsükkel *in vivo* algab sääse hammustusega selgroogsel peremehel. Viirus hakkab levima hammustuse kohast nahas ning vallandab kiiresti veres kõrge viirustiitriga vireemia. Sellisel viisil levib viirus tagasi uuele vektorputukale ja võib levida ka selgroogse peremehe teistesse kudedesse, näiteks liigestesse, lihastesse ja ajju. On näidatud, et sääse sülgel on viiruse levimise suhtes stimuleeriv toime – vektorputuka hammustuse kaudu peremehe organismi jõudev viirus põhjustab efektiivsemat infektsiooni kui seda teeb sama hulk viirust organismi süstituna (Pingen *et al.*, 2016).

1.2.1. VIIRUSE SISENEMINE RAKKU

Alfaviiruste virionid kinnituvad infektsiooni alguses rakkude pinnale E2 valgu ja raku retseptorite vahendusel ning sisenevad rakkudesse retseptor-vahendatud endotsütoosi kaudu (Joonis 4). Alfaviirused on võimelised nakatama erinevate liikide esindajaid ning rakutüüpe (Strauss ja Strauss, 1994). Paljude, kuid mitte kõigi, alfaviiruste retseptoriks selgroogsetel rakkudel on valk Mxra8 (Zhang *et al.*, 2018). Teiseks selliseks retseptoriks, mida kasutab näiteks SINV, on NRAMP (*natural resistance-associated macrophage protein*) (Rose *et al.*, 2011). Tõenäoliselt on enamus alfaviiruseid võimelised kasutama ka muid retseptoreid.

Virionide sisenemine rakkudesse toimub klatriin-sõltuva endotsütoosi teel (Joonis 4). Madala pH juures toimuvad konformatsioonilised muutused viiruse E1:E2 heterodimeerides, millele järgneb E1 valgu vabanemine ning E1 homotrimeeride moodustumine. See lubab viiruse membraanil liituda raku endosomaalse membraaniga. Membraanide ühinemisele järgneb viiruse nukleokapsiidi vabanemine rakku (Strauss ja Strauss, 1994). Nukleokapsiidi lagunemist peremeesraku tsütoplasmas kutsuvad esile rakulised ribosoomid, millel on afiinsus viiruse CPl. Nukleokapsiidi lagunedes vabaneb rakku viiruse RNA ning algab mittestruktuurse polüproteiini translatsioon (Singh ja Helenius, 1992).

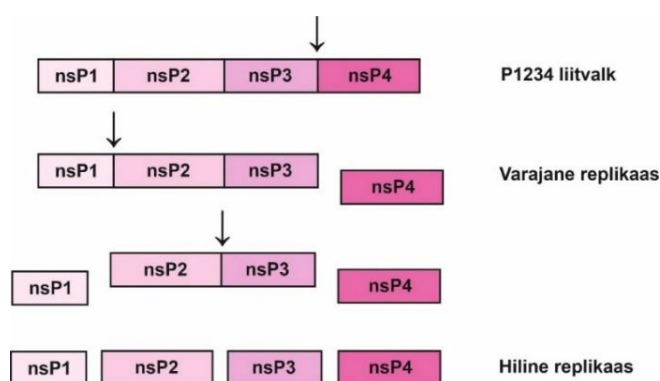


Joonis 4. Skemaatiline ülevaade alfaviiruste infektsioonitsüklist nakatunud rakus. Infektsioonitsükkel algab virioni kinnitumisega peremeesraku plasmamembraanile (kollane) retseptorite vahendusel (lillad). Sellele järgneb virioni sisenemine raku klatriin-sõltuva endotsütoosi teel. Madala pH juures toimub membraanide liitumine, mille tagajärjel vabaneb tsütoplasmasse viiruse nukleokapsiid (oranž) ning seejärel ka RNA genoom (sinine). Genoomselt RNAlt transleeritakse otse liitvalk P1234, mis läbib proteolüütilise lõikamise. Selle tulemusel moodustuvad neli iseseisvat replikatsiooniks vajalikku nsP1-4 valku, mis moodustavad replikatsioonikompleksi (erinevad roosad). Varajane P123 + nsP4 replikaas sünteesib genoomselt RNAlt negatiivse ahela (roheline), mis käitub edaspidi matriitsina positiivse ahela sünteesiks. Positiivse ahela sünteesi viivad läbi valmis ns valgud. Negatiivselt ahelalt transkribeeritakse ka SG RNA, millelt transleeritakse struktuurne liitvalk (erinevad sinised). Struktuurne liitvalk läbib proteolüütilise lõikamise ning küpsemise. Seejärel pakitakse genoomne RNA ning CP nukleokapsiidiks. Nukleokapsiid ühineb plasmamembraanil paiknevate küpsete glükovalkudega ning pungub membraanist. Vabanenud uus küpse virion on valmis uute rakkude nakatamiseks.

1.2.2. RNA REPLIKATSIOON

Alfaviiruste RNA replikatsioon toimub sfäärulites. Algselt arvati, et sellised sopistused on lüsoosomaalset ning endosomaalset päritolu (Kujala *et al.*, 2001). Tegelikult moodustuvad RCd aga nakatunud rakkude plasmamembraanil ja transporditakse hiljem (vähemalt mõne viiruse, nagu SFV, puhul) endosoomidesse/lüsoosoomidesse (Spuul *et al.*, 2010). Sfäärulite moodustumiseks on oluline viiruse ns polüproteiinide süntees. Nukleokapsiidist vabanenud viiruse positiivselt RNAlt sünteesitakse kahte tüüpi polüproteiine – P123 ning P1234.

Töötlemata P1234 polüproteiin ei ole võimeline replikatsiooni läbi viima, samas ei piisa replikatsiooni toimumiseks ka individuaalsetest nsP1-4 valkudest. On näidatud, et üksikuid ns valke rakus ekspresseerides RCsid ei moodustu (Salonen *et al.*, 2003). Seega, RCde moodustumiseks on vaja prekursori, vahe- ja lõpp-produktide olemasolu. Sellest tulenevalt on funktsionaalse RC moodustumiseks vaja läbida P1234 protsessimine (Joonis 5). Esimese sammuna toimub P1234 polüproteiini lõikamine P123 polüproteiiniks ning individuaalseks nsP4 valguks (Kallio *et al.*, 2016; Shirako ja Strauss, 1994). P123 liitvalk ning nsP4 moodustavad varajase replikaasi, mis kasutab positiivset RNA ahelat matriitsina negatiivsete ahelate sünteesil. Sünteesitud negatiivne RNA käitub edaspidi matriitsina genoomse positiivse RNA ning SG RNA sünteesimisel (Lemm *et al.*, 1994). Sellele järgneb P123 lõikamine nsP1 ning P23 liitvalguks (Joonis 5). nsP1 + P23 + nsP4 replikaas ei ole stabiilne ning püsib sellisel kujul väga lühikest aega. Selline replikaas on võimeline sünteesima nii positiivseid kui ka negatiivseid ahelaid, kuid SG RNAd sünteesib see väikese efektiivsusega. Viimase sammuna toimub P23 liitvalgu lõikamine nsP2 ja nsP3 valkudeks. Protsessimise lõpuks moodustub hiline replikaas, mis koosneb neljast iseseisvast ns valgust (nsP1-4). Hiline replikaas sünteesib nii genoomset kui ka SG RNAd (Jose *et al.*, 2009; Lemm *et al.*, 1994; J. H. Strauss ja Strauss, 1994).



Joonis 5. Alfaviiruste replikaasi eelvalgu protsessimine. Alfaviiruste replikaas transleeritakse P1234 liitvalguna. Esimese sammuna toimub lõikamine nsP3 ning nsP4 vahel ning tulemuseks on P123 + nsP4 valkudest koosnev varajane replikaas. Sellele järgneb lõikamine nsP1 ning nsP2 vahel ning tekib vahepealne ebastabiilne nsP1 + P23 + nsP4 replikaasi vorm. Viimase sammuna toimub lõikamine nsP2 ning nsP3 vahel ning moodustub hiline replikaas, mille koosseisu kuuluvad neli iseseisvat ns valku nsP1-4.

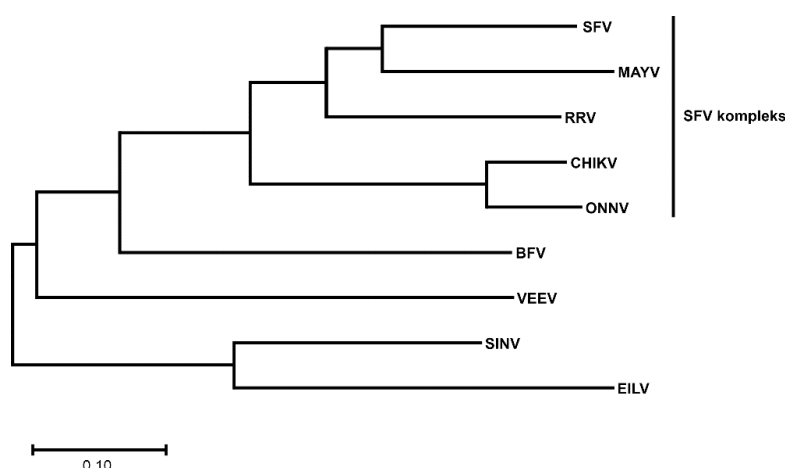
1.2.3. VIRIONIDE MOODUSTUMINE NING VABANEMINE

Alfaviiruste struktuursed valgud transleeritakse C-E3-E2-6K-E1 polüproteiinina SG RNAlt (Joonis 4). Kohe, kui CP on transleeritud, lõigatakse see autoproteolüütiliselt polüproteiini küljest lahti. Seejärel seondub CP sünteesitud genoomse RNAGA ning nad moodustavad nukleokapsiidi (Choi *et al.*, 1991). SINV puhul asub nukleokapsiidi moodustamiseks vajalik pakkimise signaal nsP1 kodeerivas alas (Weiss *et al.*, 1989). SG RNAI

selline spetsiifiline pakkimissignaal puudub. Pakkimissignaal võimaldab genoomsel RNAi CPdega seonduda, misjärel interaktsioonid CP molekulide vahel viivad nukleokapsiidi moodustamiseni (Joonis 4) (Jose *et al.*, 2009). Polüproteiini töötlemine ning vabanevate membraanivalkude küpsemine toimub ERis ning Golgi kompleksis (Joonis 4). Viimaseks sammuks on virioni vabanemine. Selles kannavad olulist rolli nii temperatuur kui pH: vabanemine toimub efektiivseimalt 37 °C ning neutraalse või kergelt aluselise pH juures (Lu ja Kielian, 2000). Nukleokapsiidid liiguvad plasmamembraanile, misjärel toimuvad interaktsioonid glükovalkude ning kapsiidivalkude vahel. Täpsemalt, CP molekulid seonduvad E2 valkudega. See on vajalik virionide vabanemiseks nakatunud rakust. Ülal loetletud interaktsioonid annavad piisavalt vaba energiat, et kapsiid saaks liikuda läbi tsütoplasma plasmamembraanile, korjates üles glükovalke, et moodustada ogastruktuurid partikli pinnal (Garoff ja Simons, 1974; Zhao ja Garoff, 1992). Lisaks kapsiidivalkude ning glükovalkude interaktsioonidele on ka teisi faktoreid, mis pole vabanemiseks hädavajalikud, kuid suurendavad oluliselt protsessi efektiivsust. Kuigi täpsed mehhanismid on veel teadmata, muudavad viirusepartikli vabanemist tõhusamaks 6K ja TF valgud ning ka raku membraani koostis, eelkõige kolesterooli sisaldus (Loewy *et al.*, 1995; Lu ja Kielian, 2000).

1.3. TÖÖS KASUTATUD VIIRUSED

Alfaviirused jagunevad 11 antigeenseks kompleksiks, kus ühte kompleksi kuuluvad viirused on omavahel lähedalt suguluses (ICTV, 2019). Käesolevasse töösse on kaasatud üheksa alfaviirust, millest viis (CHIKV, SFV, RRV, ONNV ja MAYV) kuuluvad SFV kompleksi ning neli (SINV, BFV, EILV ja VEEV) erinevatesse SFV kompleksi välistesse kompleksidesse (välisgrupp) (Joonis 6).



Joonis 6. Töös kasutatud viiruste fülogeneetiline analüüs. Fülogeneetiline puu konstrueeriti *Maximum Likelihood* meetodi ning *JTT Matrix* põhise mudeliga. Analüüs on läbi viidud üheksa alfaviiruse replikaasi aminohappelistest järjestustest. Evolutsiooniline analüüs viidi läbi MEGA-X tarkvaraga.

1.3.1. SEMLIKI KOMPLEKSI VIIRUSED

SFV kompleks on seroloogiline grupp, mille liikmetel esineb sarnaseid antigeenseid omadusi (Esposito ja Fonseca, 2017). Käesolevas töös on SFV kompleksi siseselt keskendunud CHIKV, ONNV, MAYV, RRV ning SFV uurimisele. SFV ise ei kuulu inimesele patogeensete viiruste hulka, ülejäänud neli viirust põhjustavad aga inimestele haigust, mille sümptomite hulka kuuluvad palavik, lööve ning artriit. Põhjusel, et ülaltoodud viirused kuuluvad ühte serogruppi, on neid sageli raske diagnoosimisel üksteisest eristada.

CHIKV on meditsiiniliselt kõige olulisem alfaviirus, mis on viimasel ajal põhjustanud viiruspuhanguid Euroopas, Aafrikas, Aasias ning Vaikse ja India ookeani saartel. 2013. aastal põhjustas CHIKV puhangu esmakordselt ka Ameerikates (CDC, 2019). CHIKV isoleeriti esmakordselt Tansaania palavikutunnustega inimeselt 1953. aastal (Powers *et al.*, 2000). CHIKV põhjustab Chikungunya palavikku, mille sümptomite hulka kuuluvad palavik, peavalu, iiveldus, lööve ning liigete vaegused. Haiguse kroonilises faasis tekib nakatunud polüartriit (Powers *et al.*, 2000; Weaver ja Forrester, 2015). CHIKV vektoriks on enamasti *Aedes aegypti* (tuntud ka kui linnasääsk), mis levib troopilistel ning lähistroopilistel aladel (Weaver ja Forrester, 2015). CHIKV on võimeline mutatsioonide tõttu kohastuma ka *Aedes albopictus* (tuntud ka kui metsasääsk) vektori kasutamiseks (Tsetsarkin *et al.*, 2007). See võimaldab viirusel levida ka parasvöötmes.

ONNV isoleeriti esimest korda 1959. aastal Ugandas ning on seni Aafrikas teadaolevalt põhjustanud kolm suuremat puhangut (Kiwanuka *et al.*, 1999; Suhrbier *et al.*, 2012). Levinumad sümptomid on ONNV puhul palavik, lööve ning lümfisõlmede suurenemine (Sanders *et al.*, 1999). Erinevalt CHIKVst, pole ONNVd väljaspool Aafrika mandrit kunagi tuvastatud (Levi ja Vignuzzi, 2019). Selle põhjuseks võivad olla erinevused ülekandektorites: ONNV on teadaolevalt ainus alfaviirus, mille vektoriks on öösiti tegutsevad *Anopheles* moskiitod, põhiliselt *Anopheles gambiae* ning *Anopheles funestus* (Powers *et al.*, 2000).

Fülogeneetilise analüüsi järgi (Joonis 6) on ONNV kõige lähedamalt suguluses CHIKVga. ONNV ning CHIKV moodustavad SFV serogrupis selgelt eraldi monofüleetilise grupi ning nende nukleotiidne järjestus on 90% ulatuses identne (Powers *et al.*, 2000). On ka näidatud, et tänu CHIKV ja ONNV antigeensele sarnasusele, on CHIKV vaktsiinikandidaat võimeline kaitset pakkuma ka ONNV nakkuse eest (Partidos *et al.*, 2012).

MAYV kuulub bioloogiliselt Vana Maa maailma alfaviiruste hulka. Samas, MAYV pärineb Ameerikast ja isoleeriti esmakordselt 1954. aastal Trinidad metsatööstelt. Sarnaste sümptomite tõttu diagnoositakse MAYV patsiente sageli kas Dengue või Chikungunya palavikuga. Kuigi enamasti on MAYVga seotud puhangud pigem väiksemad, siis 1978. aastal oli Brasiilias laiahaardelisem MAYV puhang, kus nakatus vähemalt 800 inimest (LeDuc *et al.*,

1981). MAYV levib enamasti *Haemagogus* moskiitode vahendusel. Hiljutises uuringus selgus, et CHIKV vastase immuunsuse omandanud hiirtel tekkis kaitse ka MAYV vastu. See näitab, et CHIKV ning MAYV sarnanevad tugevalt antigeensel tasandil. Samas, erinevalt ONNVst, CHIKV vaktsiinikandidaat MAYV vastu kaitset ei andnud (Webb *et al.*, 2019).

SFV isoleeriti 1944. aastal Semliki metsast Ugandas. SFV käitub hiirtes neurovirulentselt põhjustades entsefaliiti. SFV on kõige lähedamalt suguluses MAYVga: nende genoomide järjestused on 68,1% ulatuses identsed. Veelgi rohkem sarnanevad nad ns valkude järjestuste alusel: nende nsP1 valkude aminohappelised järjestused on 81,2% ulatuses identsed (Lavergne *et al.*, 2006).

RRV on kõige sagedasem arboviirus Austraalias. RRV isoleeriti esmakordselt 1959. aastal Ross'i jõe lähedastelt aladelt Queenslandis (Knipe *et al.*, 2016). RRV puhanguid on esinenud 1979-1980 aastatel ka Vaikse ookeani saartel, näiteks Fijil, Cook'i saartel ning Uus-Kaledoonias. RRV levib enamasti *Aedes vigilax* vektoreid kasutades (Harley *et al.*, 2001).

1.3.2. VÄLISGRUPI VIIRUSED

Lisaks SFV kompleksi kuuluvatele viirustele kasutati käesolevas töös alfaviiruste replikatsiooni uurimiseks ka viiruseid, mis kuuluvad erinevatesse kompleksidesse SFV grupi väliselt. Nn välisgrupi viiruste hulka kuuluvad SINV, BFV, EILV ning VEEV.

SINV on SFV kõrval põhiline mudelviirus, mida kasutatakse alfaviiruste uurimiseks. SINV isoleeriti esmakordselt *Culex* moskiitodest Nülose jõe deltas Egiptuses (ECDC, 2020; Kurkela *et al.*, 2008). Esimene nakatunud inimene tuvastati Ugandas 1961. aastal. SINV poolt põhjustatud haigust tuntakse Soomes kui Pogosta haigust, Rootsis kui Ockelbo haigust ning Venemaal ja Eestis kui Karjala palavikku. SINV kasutab vektoritena põhiliselt *Culex* ning *Culiseta* perekonda kuuluvaid sääski. SINV on ainus seni tuntud alfaviirus, mida on tuvastatud ka Eestis (ECDC, 2020).

EILV on ainus käesolevas töös uuritud sääse-spetsiifiline viirus, mis tähendab, et EILV ei nakata selgroogseid peremehi. EILV isoleeriti *Anopheles coustani* sääskedest Negevi kõrbes Iisraelis (Nasar *et al.*, 2012). Käesoleva töö käigus läbi viidud fülogeneetiline analüüs näitas, et töös kasutatud viiruste seas on EILVi kõige lähedasemaks sugulaseks SINV (Joonis 6). EILV sääse-spetsiifilisus on ajendanud teadlasi uurima, millistes infektsioonitsükli etappides viirusel peremehe spetsiifilisus tekib (Nasar *et al.*, 2014). SINV/EILV kimäärade uurimisel on leitud, et selgroogsete nakatamisel tekivad tõrked juba viiruse sisenemisel rakku. Teisalt on leitud (antud uurimistöö tulemusi arvestades ekslikult), et EILV ns valgud ei suuda selgroogsete rakkudes moodustada RCsid (Nasar *et al.*, 2014). Siiski on selge, et EILV sääse-spetsiifilisus on

seotud mitmete erinevate piirangutega, kus on olulised nii ns valgud kui ka struktuursed valgud (Nasar *et al.*, 2014).

BFV on peamiselt Austraalias leviv arboviirus. BFV isoleeriti 1974. aastal *Culex annulirostris* moskiitodest Barmahi metsast Austraalias (Caly *et al.*, 2019). Esimesed nakatunud inimesed tuvastati 1986. aastal ning sellest ajast saati on BFV levinud üle terve Austraalia. Sümptomite hulka kuuluvad palavik, lööve ning artriidi-tüüpi vaegused. Sarnaste sümptomite tõttu diagnoositakse sageli BFV asemel RRV või vastupidi. BFV kasutab vektoritena põhiliselt *Culex annulirostris* või *Aedes* perekonda kuuluvaid sääski (Herrero *et al.*, 2014).

VEEV, nagu ka nimest järeldada võib, põhjustab nakatunudel ägedat entsefaliiti. Üldiselt esineb VEEV looduses sääskedes ning lindudes või närilistes. Aeg-ajalt koduloomadele toimuvad ülekandumised põhjustavad puhanguid hobuste ning nende kaudu ka inimeste seas (Aguilar *et al.*, 2011). VEEV isoleeriti esmakordselt 1938. aastal surnud hobuse ajast (Kubes ja Ríos, 1939). 1950. aastal tuvastati Kolumbias esimest korda viirus ka inimestel (Sanmartin-Barberi *et al.*, 1954). VEEV on laialdaselt levinud Ameerikates.

1.4. TRANS-REPLIKATSIOONI SÜSTEEM

Alfaviiruste ns valkude transleerimisel käitub viiruse genoomne RNA kui mRNA. Seega, ns valkude ekspressioon on otseselt seotud viiruse genoomi sünteesimisega ning mutatsioonid, mis mõjutavad genoomse RNA replikatsiooni, mõjutavad ka ns valkude sünteesi. Sageli põhjustab see mutatsioonide tagasipöördumist või kompenseerimist uute mutatsioonidega. See aga raskendab oluliselt algsete mutatsioonide mõju uurimist replikaasi aktiivsusele (Lulla *et al.*, 2013; Spuul *et al.*, 2007; Žusinaite *et al.*, 2007). Selleks, et adekvaatselt uurida erinevate mutatsioonide mõju replikaasile, peavad replitseeruva viiruse RNA replikatsioon ning ns valkude süntees olema teineteisest sõltumatud. On teada, et alfaviiruste replikaasid on *trans*-aktiivsed, mis tähendab, et nad suudavad nakatunud rakus replitseerida peale viiruse enda genoomi ka näiteks vigaseid segavaid RNAsid (Levis *et al.*, 1986) või ka kunstlikult loodud *helper*-RNAsid (Liljeström ja Garoff, 1991). Tänu alfaviiruste replikaasi *trans*-aktiivsusele on võimalik olnud konstrueerida *trans*-replikatsiooni süsteeme SINV, SFV ning CHIKV jaoks (Frolova *et al.*, 2010; Spuul *et al.*, 2011; Utt *et al.*, 2016).

RNA replikatsiooni toimumiseks on vajalik funktsionaalne replikaas ning matriits-RNA, mida replikaas saab replitseerida ja transkribeerida. Alfaviiruste genoomis asuvad replikaasile äratundmiseks vajalikud järjestused UTRdes, ns regioonis nsP1 järjestuse alguses ning nsP4 järjestuse lõpus. See tähendab aga, et säilitades need järjestused, on võimalik ülejäänud genoom asendada markergeenidega, mille produktide signaalide abil saab replikaasi

aktiivsust jälgida. Sellise süsteemi kasutamine annab suurema eksperimentaalse vabaduse, sest replikaasi valkude süntees ei ole enam sõltuv viraalse genoomi replikatsioonist (Spuul *et al.*, 2011; Utt *et al.*, 2016).

1.4.1. NÄITEID *TRANS*-REPLIKATSIOONI SÜSTEEMI KASUTAMISEST SFV NING CHIKV UURIMISEL IMETAJARAKKODES

SFV puhul on *trans*-replikatsiooni süsteemi kasutatud, et uurida RCde moodustumist ning ns valkude lokaliseerimist rakkudes (Spuul *et al.*, 2011). Kõnealuses töös kasutatud süsteemis transfectiivset bakteriofaagi T7 RNA polümeraasi ekspresseerivaid imetajarakke plasmiididega, millest esimene sisaldas bakteriofaagi T7 RNA polümeraasi promootori kontrolli alla paigutatud replikaasi valke kodeerivat järjestust ning teine bakteriofaagi T7 RNA polümeraasi promootori kontrolli all olevat matriits-RNAd kodeerivat järjestust. Tagamaks kõrget liitvalkude ekspressioonitaset T7 RNA polümeraasi poolt sünteesitud *cap*-struktuurita mRNAdelt, paigutati P1234 või P123 valke kodeerivad järjestused entsefalomüokardiidi viiruse sisemise ribosoomi seondumissaidi (*encephalomyocarditis virus; internal ribosome entry site*) järgselt. Replikaasi ekspresseeriti kas P1234 liitvalguna või P123 + nsP4 valkudena. Kuna nsP4 valk algab alfaviirustel Tyr jäägiga, lisati nsP4 järjestuse ette ubikvitiini järjestus. See järjestus eemaldatakse raku valkude poolt, andes tulemuseks loodusliku N-terminusega nsP4 valgu. Lisaks konstrueeriti ka P1234 ning P123 ekspressiooniplasmiidid, mis sisaldasid nsP3 HVD alas ZsGreen markervalgu. Matriits-RNA ekspressiooniplasmiididesse lisati markergeenid. Näiteks sisaldas matriits-RNA *Renilla* lutsiferaasi (Rluc) kodeerivat järjestust kas SG promootori ees või selle järgselt. Lisaks konstrueeriti keerukamaid matriits-RNAsid tootvaid plasmide, mis sisaldasid erinevaid kombinatsioone Rluc, dtTomato ja LacZ markergeene kodeerivatest järjestustest. Kõik selles töös kasutatud matriits-RNA ekspressiooniplasmiidid sisaldasid T7 promootori järgselt viiruse 5' UTR järjestust ning nsP1 valgu 74 esimest aminohappejääki kodeerivat järjestust. Viimane oli vajalik põhjusel, et seal regioonis paiknevad replikatsiooniks olulised *cis*-elemendid (Spuul *et al.*, 2011).

Sarnaselt ülal kirjeldatud SFV *trans*-replikatsiooni süsteemile on meie uurimisgrupis konstrueeritud *trans*-replikatsiooni süsteem ka CHIKV jaoks (Utt *et al.*, 2016). See süsteem põhines samuti eraldi ekspresseeritavatel replikaasi ning matriits-RNA plasmiididel. Nagu ka SFV puhul, olid konstrueeritud CHIKV plasmiidides replikaasi ning matriits-RNAd kodeerivad järjestused bakteriofaagi T7 RNA polümeraasi promootori kontrolli all. Lisaks konstrueeriti ekspressiooniplasmiidid, kus T7 promootori asemel oli kasutatud tsütomegaloviiruse (CMV, *cytomegalovirus*) varajast promootorit. Mõlemal juhul võimendati replikaasi ekspressiooni koodon-optimeerimisega. CMV promootori puhul lisati konstrukti veel ka tavaohatise viiruse

tümidiiin-kinaasi (TK) geeni liiderjärjestus ning kunstlik intron. Markergeenidena kasutati CHIKV puhul ns valke kodeeriva regiooni asemel jaanimardika lutsiferaasi (Fluc, *Firefly luciferase*) ekspresseerivat järjestust (enne SG promootorit) ning struktuursete valkude järjestuse asemel *Gaussia* lutsiferaasi (Gluc) ekspresseerivat järjestust (SG promootori järgselt). Matriits-RNA ekspressiooniplasmiidid, kuhu sisestati markergeenid, sisaldasid analoogselt SFV matriitsidega replikatsiooniks vajalikke elemente: 307 esimest nt genoomi 5' otsast (5' UTR ja nsP1 valku kodeeriva ala algus), SG promootor ning 110 nt CHIKV genoomi 3' otsast koos 60 adeniini jäägiga (Utt *et al.*, 2016).

Tihti peale kasutatakse alfaviiruste uurimisel rekombinantseid viiruseid, mille ns valkudesse on lisatud erinevaid immunoloogilisi, afiinsus-, lutsiferaasi või fluorestsentsseid märke (Cristea *et al.*, 2010; Spuul *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2014). Enamasti lisatakse märgised nsP3 valgu HVD regiooni või ka nsP2 valku ning seda põhjusel, et need valgud sisaldavad sobivaid positsioone märgise sisestamiseks. CHIKV *trans*-replikatsiooni süsteemi kasutades prooviti leida võimalusi, kuidas efektiivsemalt viiruse ns valke märgistada. Nii loodi replikaasid, mille nsP1 valk sisaldas rohelist fluorestseeruvat valku (EGFP, *green fluorescent protein*) või ka nsP4, mille C-terminusse oli lisatud FLAG-Tag (peptiid-märke). Sellised replikaasid olid võimelised efektiivselt moodustama replikatsioonikomplekse ja matriits-RNAsid kasutama (Utt *et al.*, 2016).

CHIKV *trans*-replikatsiooni süsteemi on kasutatud ka nsP2 struktuuri uurimisel (Law *et al.*, 2019). nsP2 valgu C-terminaalse osa struktuuri ning funktsioone on palju uuritud, kuid valgu N-terminaalse helikaasse regiooni (nsP2h) kohta teatakse veel üsna vähe. Kõnealuses uurimuses läbi viidud nsP2h struktuurne analüüs näitas unikaalselt volditud N-terminaalset domeeni, millele järgnes superperekonna I RNA helikaasi volt. Leiti kolm hüdfoobset aminohappejääki (Y161, F164, F287), mis interakteerudes RNaga (*stacking* interaktsioonid) painutavad RNA ahelat. Uurimaks nende interaktsioonide mõju viiruse infektsioonitsükli viidi kõnealustesse saitidesse sisse erinevaid mutatsioone. Nende mutatsioonide mõju replikatsioonile uuriti lähemalt kasutades *trans*-replikatsiooni süsteemi, kus replikaasi ekspressiooniplasmiid oli CMV promootori kontrolli all, kuid reportereid sisaldava matriits-RNA ekspresserimiseks kasutati RNA polümeraas I promootorit (Utt *et al.*, 2019). Saadud tulemused näitasid selgelt, et kaks mutatsiooni kolmest inaktiveerisid CHIKV replikaasi aktiivsuse täielikult, samal ajal kui kolmas mutatsioon (F287A) blokeeris spetsiifiliselt SG promootori kasutamist replikaasi poolt (Law *et al.*, 2019).

1.4.2. NÄITEID *TRANS*-REPLIKATSIOONI SÜSTEEMI KASUTAMISEST CHIKV UURIMISEL PUTUKARAKKODES

Ülaltoodud näited SFV ning CHIKV *trans*-replikatsiooni süsteemidest on kasutatavad rakuliinides, kus CMV promootor on aktiivne või rakuliinides, mis ekspresseerivad stabiilselt või lühiajaliselt bakteriofaag T7 RNA polümeraasi. Seega, kumbki neist süsteemidest ei sobi replikatsiooni uurimiseks putukarakkudes. Kohandamaks süsteemi sääse rakkudele sobivaks, on hiljutises uuringus CMV promootor nii replikaasi kui ka matriits-RNA ekspressioonikonstruktid asendatud *Aedes aegypti* polüubikvitiini promootoriga (Bartholomeeusen *et al.*, 2018). Kohandatud süsteemi kasutati, et uurida 17 mutatsiooni mõju RNA replikatsioonile sääse rakkudes ja võrrelda seda tulemust imetajarakkudes saaduga. Ettearvatult leiti, et mutatsioonid, mis blokeerivad ns valkude ensümaatilisi aktiivsuseid blokeerivad replikaasi aktiivsuse nii putuka- kui ka imetajarakkudes. Lisaks oli mõlemas rakutüübis sarnane mõju ka EGFP insertioonide lisamisel nsP1-3 valkudesse. Uurides P1234 polüproteiini töötlemist aeglustavate mutatsioonide mõju replikaasi aktiivsusele avastati aga, et kui imetajarakkudes avaldasid sellised mutatsioonid replikaasile inhibeerivat toimet või olid funktsionaalselt neutraalsed, siis putukarakkudes tõstsid need mutatsioonid oluliselt replikaasi aktiivsust. See näitab selgelt, et alfaviiruste ning ka teiste arboviiruste replikatsiooni uurimiseks on hädavajalik kasutada nii imetaja- kui ka putukarakke (Bartholomeeusen *et al.*, 2018).

1.4.3. RNA POLÜMERAAS I PÕHINE *TRANS*-REPLIKATSIOONI SÜSTEEM

Ülal toodud uuringutes kasutati erinevaid *trans*-replikatsiooni süsteeme, kus matriits-RNA ekspresiooniplasmiidid olid kas CMV varajase promootori, bakteriofaag T7 RNA polümeraasi promootori või *Aedes aegypti* polüubikvitiini promootori kontrolli all. Nagu ka juba mainitud, on neil *trans*-replikatsiooni süsteemidel omad puudused. T7 promootori põhised süsteemi saab kasutada ainult kunstlikes rakuliinides, kus ekspresseeritakse bakteriofaag T7 RNA polümeraasi. CMV ning polüubikvitiini süsteemid on RNA polümeraas II promootori põhised. RNA polümeraas II põhiseid süsteeme saab kasutada küll erinevates rakuliinides, kuid selliste süsteemide tundlikkus on tunduvalt madalam kui T7 RNA polümeraasil põhinevatel süsteemidel. RNA polümeraas II süsteemide väiksem tundlikkus avaldub markergeenide madalamas aktiveerimise tasemes. See efekt on põhjustatud kõrge taustast, mis saadakse rakkude transfekterimisel reportergeene sisaldava matriits-RNAd kodeeriva plasmiidiga (Bartholomeeusen *et al.*, 2018; Utt *et al.*, 2016). Kõrge taust CMV põhistel süsteemidel tekib seetõttu, et RNA polümeraas II poolt sünteesitud RNAd omavad, erinevalt T7 RNA polümeraasi põhisest süsteemist pärinevatest RNAdest, 5' *cap*-struktuuri, mistõttu transleeritakse neid efektiivselt. Kuna matriits-RNA on bitsistruone RNA, siis puudutab see

translatsioon eelkõige esimest, ns regioonile vastavat ORFi. Selle tagajärjel on raske hinnata kas ja kui palju aktiveerib replikaas genoomi replikatsiooni. Sellest järeldub, et *trans*-replikatsiooni süsteemi tundlikkust saab oluliselt suurendada kasutades RNA polümeraase, mille transkriptidele 5' *cap*-struktuure ei lisata. Üheks selliseks on RNA polümeraas I, mille põhine *trans*-replikatsiooni süsteem konstrueeriti esmalt CHIKV jaoks (Utt *et al.*, 2019). Järgnevalt on RNA polümeraas I põhised imetajarakkudele sobivad *trans*-replikatsiooni süsteemid konstrueeritud veel seitsemele alfaviirusele: SINV, BFV, VEEV, ONNV, MAYV, RRV ning SFV (Götte *et al.*, 2020). Põhjusel, et mõned kõnealuses töös kasutatud patogeenid (VEEV, MAYV) nõuaksid töötamiseks kolmanda bioohutustaseme (BSL3, *biosafety level 3*) laboreid, oli *trans*-replikatsiooni süsteemi kasutamine hea võimalus katsete läbiviimist lihtsustada. Nii kasutati RNA polümeraas I põhist *trans*-replikatsiooni süsteemi uurimaks Vana Maailma alfaviiruste sõltuvust peremeesraku päritolu G3BP valgust. Töö tulemused näitasid, et osad viirused seda valku ei vaja, samal ajal, kui teistele on see replikatsiooniks oluline või isegi hädavajalik. Samuti võimaldas *trans*-replikatsiooni süsteem kindlaks määrata infektsiooni etapi, mille jaoks G3BP oluline on. Selleks osutus negatiivse RNA ahela süntees (Götte *et al.*, 2020).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. TÖÖ EESMÄRGID

Käesolev magistritöö on läbi viidud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi RNA viiruste uurimisrühma ning Antwerpeni Troopilise Meditsiini Instituudi viroloogia töögrupi vahelise koostööprojekti raames. Magistritööle andis osaliselt ainet autori bakalaureusetöö, kus uuriti alfaviiruste replikaaside jagamist funktsionaalseteks komponentideks. Teisalt arenes magistritöö välja eelnevast koostööst samade laborite vahel, mille käigus uuriti näiteks alfaviiruste replikatsiooni putuka- ning selgroogsete peremeeste rakkudes (Bartholomeeusen *et al.*, 2018). Seetõttu olid juba eelnevalt valmistatud mitmed töövahendid ning optimeeritud erinevad protokollid.

Bakalaureusetöös läbi viidud katsetest oli teada, et SINV, CHIKV ja RRV järjestuste seas on SINV matriits-RNA kõige universaalsem, st seda suutsid efektiivselt kasutada kõik kolm replikaasi. Samas nähti, et SINV replikaas CHIKV ja RRV matriits-RNAsid efektiivselt replitseerida ei suutnud. Lisaks, CHIKV ja RRV kasutasid teineteise matriits-RNAsid suhteliselt sarnaselt oma enda RNAle. See viis omakorda küsimuseni, et mis põhjustab sellist matriits-RNA spetsiifilisust erinevate alfaviiruste replikaaside seas. Selleks, et uurimus läbi viia võimalikult usaldusväärselt ning arvestades alfaviiruste bioloogilise mitmekesisusega, otsustati kaasata lisaks bakalaureusetöös kasutatud SINV, CHIKV ning RRVle kavandatud uuringusse ka teisi SFV kompleksi kuuluvaid ning SFV kompleksiväliseid ehk välisgruppi kuuluvaid viiruseid. Lõppkokkuvõttena kujunes valik järgmiseks:

- 1) Uurimusse kaasatud SFV kompleksi viirused – SFV, CHIKV, ONNV, MAYV, RRV
- 2) Uurimusse kaasatud välisgrupi viirused – SINV, BFV, VEEV, EILV

Eelnevate meie uurimisrühmas läbi viidud uurimuste (Utt *et al.*, 2016, 2019) ning erinevate koostööprojektide (Bartholomeeusen *et al.*, 2018; Götte *et al.*, 2020) tõttu olid magistritöö alguseks juba valmis kaheksa ülalmainitud viiruse (va EILV) *trans*-replikatsiooni süsteemi imetajarakkudele ning lisaks ka CHIKV *trans*-replikatsiooni süsteem vektorputukarakkudele.

Käesoleva magistritöö eesmärkide hulka kuulusid:

- 1) Testida sääse-spetsiifilise EILV *trans*-replikatsiooni süsteemi funktsionaalsust imetajarakkudes ning SINV, BFV, EILV, VEEV, ONNV, MAYV, RRV ning SFV *trans*-replikatsiooni süsteemi vektorputukarakkudes.
- 2) Luua *trans*-replikaasidel põhinev testsüsteem, millega on võimalik läbi viia suuri RNA matriitside ning replikaaside ristkasutamise katsepaneele uurimaks

alfaviiruste matriits-RNAde kasutamise spetsiifikat erinevate replikaaside poolt ning teostada vastavad katsed.

- 3) Lähtudes RNA matriitside ning replikaaside ristkasutamise uurimisel saadud tulemustest, konstrueerida hübriidsed RNA matriitsid määramaks replikatsiooniks ja transkriptsiooniks vajalikke matriits-RNAde regioone.

Magistritöö esitamise ajaks on katsete tulemused kokku võetud magistritööle lisatud artiklis „Cross-utilisation of template RNAs by alphavirus replicases” (Lisa 1), mille autoriteks on Laura Sandra Lello, Age Utt, Koen Bartholomeeusen, Sainan Wang, Kai Rausalu, Catherine Kendall, Sandra Coppens, Rennos Fragkoudis, Andrew Tuplin, Luke Alphey, Kevin K. Ariën ja Andres Merits. Artikkel on peale kahte ringi täiendusi ja parandusi vastu võetud ajakirja “PLoS Pathogens”. Allpool toodud tööde ja tulemuste kirjelduses on välja toodud minu poolt teostatud katsed ja nende tulemused.

2.2. MATERJAL JA METOODIKA

Magistritöö on läbi viidud koostööprojekti raames Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudi RNA viiruste uurimisrühma ning Antwerpeni Troopilise Meditsiini Instituudi viroloogia töögrupi vahel. Projekti algusfaas, sh katsete planeerimine, testsüsteemi katsetamine ning pilootkatsed on läbi viidud Antwerpenis. Magistritöö põhifaas, sh RNA matriitside ning replikaaside ristanalüüsi katsepaneelid, tulemuste analüüs, hübriidseid RNA matriitse kodeerivate plasmiidide konstrueerimine ning nende testimine on läbi viidud Tartus.

2.2.1. PLASMIIDIDE KONSTRUEERIMINE: MATRIITS-RNA EKSPRESSIOONIPLASMIIDID

Inimese RNA polümeraas I promootori põhised matriits-RNA ekspressioonikonstruktid: Matriits-RNA ekspressiooniplasmiidid on tähistatud üldnimega HSPolI-Fluc-Gluc (lühemalt HSPolI-FG), kus HSPolI tähistab *Homo sapiens* RNA polümeraas I promootorit ning Fluc-Gluc plasmidi lisatud *Firefly* ning *Gaussia* lutsiferaasi geenide järjestusi (Joonis 7B). Kõik HSPolI-FG ekspressiooniplasmiidid on konstrueeritud kasutades sama metoodikat.

1. HSPolI-FG-SINV, HSPolI-FG-CHIKV ja HSPolI-FG-RRV ekspressiooniplasmiidid olid varasemalt valmistatud töö autori poolt bakalaureusetöö raames.
2. HSPolI-FG-BFV, HSPolI-FG-VEEV, HSPolI-FG-ONNV, HSPolI-FG-MAYV, HSPolI-FG-SFV ekspressiooniplasmiidid olid varasemalt valmistatud juhendaja Andres Meritsa poolt (Götte *et al.*, 2020; Utt *et al.*, 2019).

3. HSPoII-FG-EILV ekspressiooniplasmiid valmistati käesoleva magistritööga seotud projekti raames juhendaja Andres Meritsa poolt.

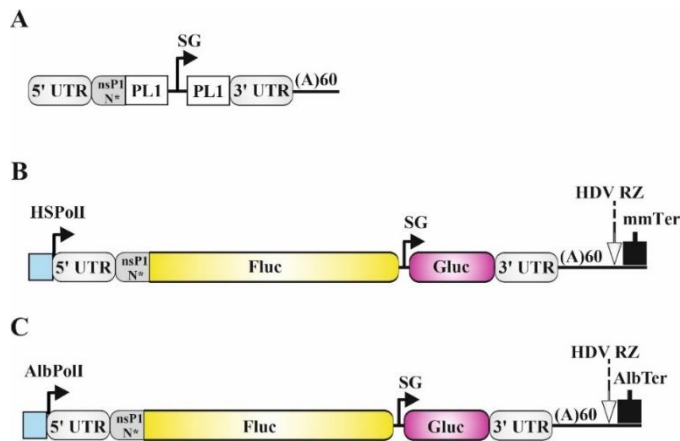
HSPoII-FG plasmiidide kokkupanemisel kasutati sünteetilisi DNA fragmente (GenScript, USA). Alustuseks konstrueeriti ekspressioonikassett, mis sisaldas replikatsiooniks vajalikke elemente ning kuhu sai lisada markergeene. See kassett sisaldas järgnevaid elemente (Joonis 7A):

1. Täispikkuses 5' UTR järjestus ning nsP1 valku kodeeriva järjestuse algus (tulenevalt erinevate viiruste erinevatest konserveerunud SL struktuuridest erines selle järjestuse pikkus vastavalt viirustele (Lisa 1, Supporting Figure 1))
2. Polülinter 1 (PL1), mis koosneb kahest restriksiooniensüümi äratundmissaidist (*ApaI* ja *PacI*)
3. SG promootor ning geenidevaheline mittekodeeriv ala
4. Polülinter 2 (PL2), mis koosneb kahest restriksiooniensüümi äratundmissaidist (*NotI* ja *BglII*)
5. 110 nukleotiidi 3' UTR lõpust
6. 60 järjestikust A jääki

See ekspressioonikassett paigutati RNA polümeraas I promootori kontrolli alla. Kasseti lõppu lisati hepatiit delta negatiivse ahela ribosüüm nii, et selle poolt katalüüsitud lõikamine toimuks polü(A) järjestuse viimase nukleotiidi järgselt. Ribosüümi järgi paigutati RNA polümeraas I terminaatorjärjestus. PL1 abil viidi kassetti Fluc järjestus ning PL2 abil Gluc järjestus.

Putukarakkude RNA polümeraas I promootori põhised matriits-RNA ekspressioonikonstruktid: Putukarakkude matriits-RNA ekspressiooniplasmiidid nimetati AlbPoII-Fluc-Gluc (lühidalt AlbPol-FG), kus AlbPoII tähistab *Aedes albopictus* RNA polümeraas I promootorit (Joonis 7C). Võrdluseks, imetajarakkudes kasutatud HSPoII-FG-CHIKV kannab putukarakkude puhul nime AlbPoII-FG-CHIKV jne (võrdle Joonised 7B ja 7C).

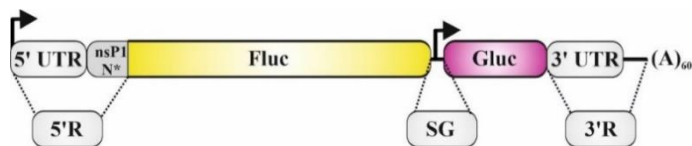
1. AlbPoII-FG-CHIKV ekspressiooniplasmiid oli varasemalt konstrueeritud juhendaja Andres Meritsa poolt (Utt *et al.*, 2019).
2. AlbPoII-FG-SINV, AlbPoII-FG-BFV, AlbPoII-FG-VEEV, AlbPoII-FG-EILV, AlbPoII-FG-ONNV, AlbPoII-FG-MAYV, AlbPoII-FG-RRV, AlbPoII-FG-SFV ekspressiooniplasmiidid valmistati käesoleva magistritööga seotud projekti raames juhendaja Andres Meritsa poolt. Plasmiidid konstrueeriti kasutades ülaltoodud HSPoII-FG plasmiidide puhul rakendatud lähenemist.



Joonis 7. (A) Matriits-RNA ekspressiooniplasmiidi toorik; nsP1 N* - nsP1 valgu kodeeriva järjestuse algus, pikkus on erinevate viiruste puhul 231 (CHIKV) – 342 (SINV) nukleotiidi jääki; PL1 – polül linker 1, sisaldab *ApaI* ning *PacI* restriktsooniensüümide äratundmissaiti; SG – subgenoomne promootor; PL2 – polül linker 2, sisaldab *NotI* ning *BglII* restriktsooniensüümide äratundmissaiti, (A)60 – 60 A jääki; (B) HSPoII-FG matriits-RNA ekspressiooniplasmiid; HSPoII – *Homo sapiens* RNA polümeraas I promootor; Fluc – *Firefly* lutsiferaasi kodeeriva geeni järjestus; Gluc – *Gaussia* lutsiferaasi kodeeriva geeni järjestus; HDV RZ – hepatiit delta viiruse ribosüüm; mmTer – hiire RNA polümeraas I terminaator. (C) AlbPoII-FG matriits-RNA ekspressiooniplasmiid: AlbPoII – *Aedes albopictus* RNA polümeraas I promootor; Fluc – *Firefly* lutsiferaasi kodeeriva geeni järjestus; Gluc – *Gaussia* lutsiferaasi kodeeriva geeni järjestus; (A)60 – 60 järjestikust A jääki; HDV RZ – hepatiit delta viiruse ribosüüm; AlbTer – *Aedes albopictus* RNA polümeraas I terminaator. Joonised kohandatud (Utt *et al.*, 2019).

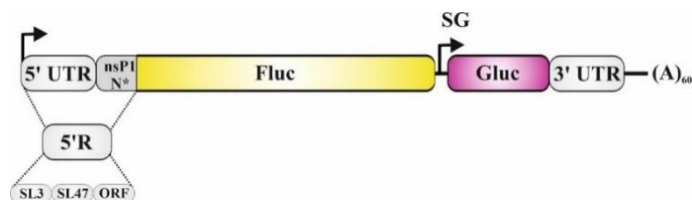
SINV/CHIKV ja CHIKV/RRV hübriidsed matriits-RNA ekspressiooniplasmiidid:

Põhjusel, et eelnevalt konstrueeritud CHIKV matriits-RNAs oli nsP1 valgu N-osa kodeeriva järjestuse pikkus lühem kui SINV matriits-RNAs (vastavalt 231 ja 342 nukleotiidijääki), pikendati CHIKV RNA matriitsi 5' otsa sarnase pikkuseni, lisades seda kodeerivale plasmiidile 105 nt CHIKV icDNast. See plasmiid kannab edaspidi nime HSPoII-FG-C*CC ning sellele vastab SINV matriits-RNA ekspressiooniplasmiid HSPoII-FG-SSS (HSPoII-FG-SINV paralleelne nimetus, kasutatud lihtsustamiseks hübriidsete konstruktide kirjeldamist). CHIKV ja RRV hübriidsed matriitsid konstrueeriti kasutades CHIKV ja RRV matriits-RNA plasmiide HSPoII-FG-CHIKV ja HSPoII-FG-RRV (ülal toodud põhjusel kasutati paralleelnimetustena HSPoII-FG-CCC ja HSPoII-FG-RRR). Hübriidsete matriits-RNade konstruktide tegemisel kasutati standardseid klonereimise meetodeid. Matriitside lõikude vahetamisel jagati matriits-RNA kolmeks osaks (Joonis 8): 5' regioon (5'R), SG regioon ning 3' regioon (3'R). Neid regioone vahetati viiruste vahel nii, et tekiks kõikvõimalikud kombinatsioonid. SINV/CHIKV ning CHIKV/RRV hübriidsed matriits-RNA ekspressiooniplasmiidid konstrueeriti töö autori poolt.



Joonis 8. Skemaatiline ülevaade hübriidsetest matriits-RNA ekspressioonikonstruktidest; 5'R – 5' regioon, mis sisaldab täies pikkuses 5' UTR ning nsP1 alguse järjestusi; SG – SG regioon; 3'R – 3' regioon, mis sisaldab 3' UTR järjestust.

SINV/CHIKV 5'R hübriidsed matriits-RNA ekspressiooniplasmiidid: Lisaks ülal toodud matriitside kolmeregioonsetele vahetustele konstrueeriti ka SINV/CHIKV matriits-RNA plasmiidid, mis sisaldasid vahetusi 5' regiooni siseselt (Joonis 9). Nende plasmiidide konstrueerimisel kasutati sünteetilisi DNA fragmente (GenScript, USA) ning standardseid kloneerimise meetodeid. Plasmiidid konstrueeriti käesoleva magistritööga seotud projekti raames juhendaja Andres Meritsa poolt. Vahetusteks jagati 5'R kolmeks osaks: SL3, SL47 ning nsP1 ORF algus (Joonis 9).



Joonis 9. Skemaatiline ülevaade 5'R hübriidsetest matriits-RNA ekspressioonikonstruktidest. SL3 – stemloop 3; SL47 – stemloop 47; ORF – nsP1 ORF algus.

2.2.2. PLASMIIDIDE KONSTRUEERIMINE: REPLIKAASI EKSPRESSIOONI-PLASMIIDID

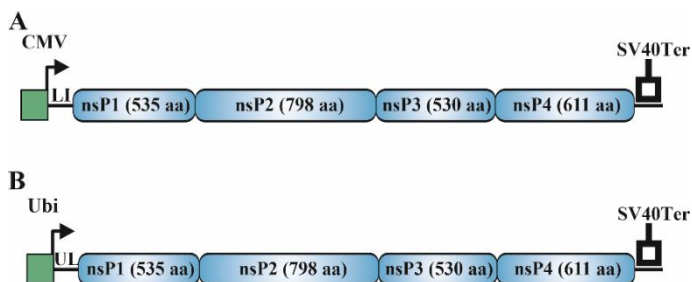
Imetajarakkudes kasutatavad CMV promootori põhised replikaasi ekspressioonikonstruktid: Replikaasi ekspressiooniplasmiidid nimetati üldnimega CMV-P1234 ning inaktiivsed replikaasid üldnimega CMV-P1234^{GAA} (Joonis 10A). Kõikide CMV-P1234 ning CMV-P1234^{GAA} ekspressiooniplasmiidide konstrueerimisel kasutati sama metoodikat.

1. CMV-P1234-CHIKV, CMV-P1234-SINV ja CMV-P1234-RRV ning vastavate replikaaside inaktiivsed variandid olid varasemalt valmistatud töö autori poolt bakalaureusetöö raames.
2. CMV-P1234-SFV, CMV-P1234-MAYV, CMV-P1234-ONNV, CMV-P1234-BFV, CMV-P1234-VEEV ning vastavate replikaaside inaktiivsed variandid olid varasemalt valmistatud juhendaja Andres Meritsa poolt (Götte *et al.*, 2020).
3. CMV-P1234-EILV ning CMV-P1234^{GAA}-EILV ekspressiooniplasmiidid valmistati käesoleva magistritööga seotud projekti raames juhendaja Andres Meritsa poolt.

Kõik ülaltoodud konstruktid pandi kokku sünteetilisest DNA fragmentidest (GenScript, USA) ning vastavate infektsiooniliste cDNAde restriksioonifragmentidest. Inaktiivse replikaasi P1234^{GAA} variantide konstrueerimisel kasutati saitspetiifilist mutageneesi.

Putukarakkudes kasutatavad Ubi promootori põhised replikaasi ekspressioonikonstruktid: Replikaasi ekspressiooniplasmiidid nimetati üldnimega Ubi-P1234 ning inaktiivsed replikaasid üldnimega Ubi-P1234^{GAA}, kus Ubi tähistab *Aedes aegypti* polüubikvitiini promootorit (Joonis 10B). Kõikide Ubi-P1234 ning Ubi-P1234^{GAA} ekspressiooniplasmiidide konstrueerimisel kasutati ülaltoodud imetajarakkude konstruktide puhul kasutatud meetodikat.

Ubi-P1234-CHIKV, Ubi-P1234-RRV, Ubi-P1234-SFV, Ubi-P1234-MAYV, Ubi-P1234-ONNV, Ubi-P1234-SINV, Ubi-P1234-BFV, Ubi-P1234-VEEV, Ubi-P1234-EILV ning vastavate replikaaside inaktiivsed variandid valmistati käesoleva magistritööga seotud projekti raames juhendaja Andres Meritsa poolt.



Joonis 10. Skemaatiline ülevaade imetaja- ning vektorputukarakkudes kasutatud P1234 ekspressioonikonstruktidest CHIKV näitel. (A) CMV-P1234 ekspressioonikonstrukt; CMV – inimeste tsütomegaloviiruse varajane promootor; LI – tavaohatise viiruse tümidiin-kinaasi geeni liiderjärjestus kunstliku introniga; SV40Ter – Ahvide viiruse 40 hiline polüadenülatiooni regioon. **(B)** Ubi-P1234 ekspressioonikonstrukt; Ubi – *Aedes aegypti* polüubikvitiini promootor; UL – *Aedes aegypti* polüubikvitiini liiderjärjestus loodusliku introniga. Joonis on kohandatud (Utt *et al.*, 2019)

2.2.3. REKOMBINANTSETE DNAde VALMISTAMINE

Konstruktide valmistamisel kasutati Thermo Fisher Scientific restriksiooniensüüme. Restriksiooniprodukte kontrolliti 0,8% agarosgeelil, mida jooksutati 1x TAE puhvris. Lõikeproduktid, mis käitusid kloneerimisel insertidena lõigati välja otse geelist ning puhastati *Zymoclean Gel DNA Recovery Kit*ga (Zymo Research). Lõikeprodukte, mis käitusid kloneerimisel vektoritena, töötleti Thermo Fisher Scientific aluselise fosfaasiga (1 µl *FastAP* 1 µg DNA kohta), et vältida vektori iseendale ligeerumist. *FastAP* töötluse läbinud DNA puhastati *DNA Clean and Concentration Kit*ga (Zymo Research).

Ligatsiooniks kasutati „Invitrogen“ T4 DNA ligaasi (Thermo Fisher Scientific). Ligatsioonisegusse lisati puhastatud vektori ning inserti fragmendid molaarses suhtes ligikaudu

1:3, 0,5 µl T4 ligaasi, 2µl 5x T4 DNA ligaasipuhvrit. Maht viidi veega 10 µl-ni ja segu inkubeeriti toatemperatuuril ühe tunni jooksul. Plasmiidide valikuks ja paljundamiseks kasutati *E. coli* tüve XL-10, mida transformeeriti kuumašoki (42 °C, 90 sekundit) meetodit kasutades. Bakterikultuure kasvatati 37 °C juures ~16 tundi „Difco“ SOY tard- või vedelsöötmes (Becton Dickinson). DNA eraldati *Plasmid Extraction Mini Kit*ga (FavorPrep) ning viidi läbi kontrollrestriksioonid. Restriksiooni pildi järgi valitud produktide järjestusi kontrolliti Sanger sekveneerimise abil. Õigeid konstrukte sisaldavaid baktereid kasvatati 37 °C juures üleöö suuremas mahus. Vastavad DNAd eraldati kasutades *Endo-free Midipreps Kiti* (Macherey-Nagel). Kõik puhastatud DNAd lahustati endotoksiinide vabas vees. Saadud plasmiidide kontsentratsioonid määrati NanoDrop spektrofotomeetri abil.

2.2.4. EKSPERIMENTIDE LÄBI VIIMINE KOEKULTUURIS

Käesolevas uurimuses kasutatud rakuliinid ning nende kasvatamine:

1. U2OS – inimese osteosarkoomi epiteelkoe päritolu rakud. U2OS rakke kultiveeriti IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, Pan-Biotech) söötmes, millele oli lisatud 10% veise loote seerumit ja antibiootikumid (Pen+Strep). U2OS rakkudega viidi transfektsioone läbi 12-augustel plaatidel, kuhu külvati eelneval päeval $2,0 \cdot 10^5$ rakku augu kohta.
2. HEK293T – inimese embrüonaalsed neerurakud. HEK293T rakke kultiveeriti DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Pan-Biotech) söötmes, millele oli lisatud 10% veise loote seerumit ja antibiootikumid (Pen+Strep). HEK293T rakkudega viidi läbi katsepaneele 96-augustel plaatidel, kuhu külvati $3,5 \cdot 10^4$ rakku augu kohta katsele eelneval päeval. HEK293T rakke transfekteeeriti ka 6-augustel plaatidel, et hiljem lüsaadist eraldatud RNAd analüüsida northern blot meetodil. 6-augusele plaadile külvati $2 \cdot 10^6$ rakku augu kohta.
3. C6/36 – *Aedes albopictus* rakud. C6/36 rakke kultiveeriti Leibovitz L15 söötmes (Corning), millele oli lisatud 10% veise loote seerumit ja antibiootikumid (Pen+Strep). C6/36 rakkudega viidi läbi katsepaneele 96-augustel plaatidel, kuhu külvati eelneval päeval $3,5 \cdot 10^4$ rakku augu kohta. Lisaks transfekteeeriti C6/36 rakke Northern Blot analüüsi tarbeks ka 6-augustel plaatidel, kuhu külvati eelneval päeval $2 \cdot 10^6$ rakku augu kohta.

Inimese rakke kultiveeriti reeglina 37 °C juures 5% CO₂ atmosfääris, sääse rakke kultiveeriti 28 °C juures täiendavat CO₂ lisamata.

DNA transfektsioon ja lutsiferaaside aktiivsuste mõõtmine: Kõikide transfektsioonide puhul kasutati Lipofectamine LTX reagenti koos PLUS reagendiga (Thermo

Fisher Scientific). Transfektsioonid viidi läbi vastavalt tootja poolt antud protokollidele. Ekspressiooniplasmiidide kogused varieerusid transfekteerimisel vastavalt formaadile:

- 6-auguse formaadi puhul kasutati igat ekspressiooniplasmiidi 2 µg ühe augu kohta.
- 12-auguse formaadi puhul kasutati igat ekspressiooniplasmiidi 1 µg ühe augu kohta.
- 96-auguse formaadi puhul kasutati igat ekspressiooniplasmiidi 50 ng ühe augu kohta.

Lisaks varieerus transfektsioonile järgneva inkubatsiooni temperatuur ning aeg. HEK293T ning U2OS rakke inkubeeriti 37 °C juures 18 tundi. EILV puhul inkubeeriti HEK293T rakke ka 28 °C juures 48 tundi. C6/36 rakke inkubeeriti 28 °C juures 4 tundi, millele järgnes söötme vahetamine. Peale seda jätkus inkubatsioon 48 tunni jooksul 28 °C juures.

Käesolevas töös kasutatud matriits-RNA ekspressiooniplasmiidid sisaldasid Fluc ja Gluc reportervalke kodeerivaid järjestusi. Fluc ja Gluc aktiivsuste mõõtmiseks rakkude lüsaadist kasutati *Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit*-i (Promega), sama firma poolt toodetud *Glomax* luminomeetrit ning tootja poolt antud protokolle.

RNA eraldamine ja analüüsimine northern blot meetodil: Rakke transfekteeriti 6-augustel plaatidel. 18 tundi (HEK293T) või 48 tundi (C6/36) hiljem eraldati rakkudest totaalne RNA kasutades *TriZol* reagenti (Life Technologies). Totaalset RNAd kasutati northern blot analüüsi läbi viimiseks. Viiruslike positiivsete RNAd detekteerimiseks kasutati 2 µg totaalset RNAd ning negatiivse ahela detekteerimiseks 10 µg totaalset RNAd. RNA denatureeriti 10 minuti jooksul 70 °C juures 2x RNA laadimisvärviga (*loading dye*, Thermo Fisher Scientific). Seejärel jahutati RNA jääl ning kanti denatureerivale 1% agarosgeelile (sisaldas 6% formaldehüüd) 1x MOPS puhvris (3-(N-morfoliino)propaansulfoonhape). Elektroforeesi abil lahutatud RNA kanti geelist *Hybond-N+* filtrile (GE Healthcare) ja fikseeriti UV-krosslinkimisega (UV Stratalinker 1800, Stratagene). Positiivsete RNAd detekteerimiseks kasutati dioksügeeni (DIG) märgisega RNA sondi, mille järjestus oli komplementaare Gluc markerit kodeeriva järjestusega (nukleotiidid 42-390). Negatiivse ahela detekteerimiseks kasutati DIG-märgisega RNA sondi, mille järjestus vastas Fluc markerit kodeerivale järjestusele (nukleotiidid 51-376). Filtreid hübridiseeriti 16 tunni jooksul 68 °C juures. Membraanid pesti ning signaali ilmutamiseks kasutati Roche toodetud reagentide ja röntgenfilmi.

Voolutsütomeetria: HSPolI-FZsG-CHIKV ja AlbPolI-FZsG-CHIKV RNA matriitse kodeerivad plasmiid saadi vahetades HSPolI-FG-CHIKV ja AlbPolI-FG-CHIKV plasmiidides Gluc markerit kodeerivad järjestused ZsGreen markerit kodeerivate järjestuste vastu. HEK293T rakke kotransfekteeriti 12-augustel plaadil 1 µg HSPolI-FZsG-CHIKV ning 1 µg CMV-P1234-CHIKV ekspressiooniplasmiididega. C6/36 rakke kotransfekteeriti 1 µg AlbPolI-FZsG-CHIKV ning 1 µg Ubi-P1234-CHIKV ekspressiooniplasmiididega. Rakuliine

transfekteeriti ka EGFP markervalku ekspresseerivate kontrollplasmiidega CMV-EGFP ja Ubi-EGFP. 18 (HEK293T) või 48 (C6/36) tundi pärast transfektsiooni koguti rakud 500 µl 1x PBSga (*Phosphate Buffered Saline*, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,8 mM KH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) ning analüüsiti tsütomeetriga (*Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer*). Iga proovi kohta salvestati 30000 sündmust. Andmeid analüüsiti *Attune NxT* tarkvaraga (Attune).

Statistiline analüüs: Statistiline analüüs viidi läbi kasutades GraphPad Prism tarkvara. Andmeid analüüsiti sõltumatu Student T-testiga. P-väärtuseid ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01 (**), ≤ 0.001 (***) and ≤ 0.0001 (****) kasutati statistilise olulisuse näitamiseks.

2.3. TULEMUSED JA ARUTELU

Varasemalt on näidatud kaheksa alfaviiruse näitel, et alfaviiruste replikaasid on võimelised imetajarakkudes replitseerima iseenda (homoloogilist) matriits-RNAd (Götte *et al.*, 2020; Spuul *et al.*, 2011; Utt *et al.*, 2016, 2019). CHIKV puhul on see näidatud ka sääse rakkudes (Bartholomeeusen *et al.*, 2018; Utt *et al.*, 2019). Selle magistritööga seotud projekti raames konstrueeriti juhendaja Andres Meritsa poolt nii imetaja- kui ka sääse rakkude jaoks sobivad *trans*-replikatsiooni süsteemid sääse-spetsiifilisele Eilat viirusele ning sääse rakkudele sobivad *trans*-replikatsiooni süsteemid SINV, BFV, VEEV, ONNV, MAYV, RRV ning SFV jaoks. See andis kokku üheksast *trans*-replikatsiooni süsteemist koosnevad komplektid nii imetaja- kui ka sääse rakkude kohta. Selleks, et erinevate viiruste *trans*-replikaasi süsteemidega saadud tulemused oleksid omavahel võrreldavad, kasutati kõikide nende konstruktide saamiseks replikaaside geenide looduslikke (st koodon-optimeerimata) nt järjestusi.

Käesolevas töös uuritud SFV, CHIKV, ONNV, MAYV ning RRV kuuluvad SFV kompleksi ning SINV, BFV, EILV ning VEEV erinevatesse SFV kompleksi välistesse kompleksidesse (Joonis 6). Erinevatesse kompleksidesse kuuluvate viiruste puhul kasutati matriits-RNA ekspressiooniplasmiidide konstrueerimisel mõnevõrra erinevaid lähenemisi. CHIKV 5' regioonis esineb seitse SL struktuuri, mis täidavad olulisi ülesandeid viiruse replikatsioonil imetaja- ning putukarakkudes (Kendall *et al.*, 2019). Sarnast struktuuri ennustati ka SFVle, ONNVle, MAYVle ning RRVle (Lisa 1, Supporting Figure 1) ja seetõttu on nende viiruste matriits-RNA ekspressiooniplasmiidide konstrueerimisel kasutatud CHIKV matriits-RNA disainile identset disaini: genoomi 5' UTR järjestusele järgneb 231 nt, mis kodeerivad nsP1 valgu N-otsa poolset osa (Utt *et al.*, 2016). Välisgrupi viiruste puhul nii selget RNA sekundaarstruktuuride omavahelist joondumist tuvastatud ei ole (Lisa 1, Supporting Figure 1). Seetõttu kasutas juhendaja Andres Merits võrreldes CHIKV matriits-RNaga välisgrupi viiruste puhul 5' UTRle järgnevas nsP1 N-otsa poolses lõigus pikemaid järjestusi. Nii kasutati EILV puhul 258, VEEV puhul 267, BFV puhul 339 ning SINV puhul 342 nt pikkuseid järjestusi.

Lihtsuse mõttes on edaspidi nimetatud täispikka Fluc markerit kodeerivat RNAd genoomseks RNAks ning lühemat SG promootorit kasutades sünteesitud Gluc markerit kodeerivat RNAd SG RNAks. Genoomse RNA sünteesist räägitakse edaspidi kui replikatsioonist ning SG RNA sünteesist kui transkriptsioonist. Kõiki *trans*-replikaaside poolt sünteesitud RNAsid on kokkuvõtvalt nimetatud viraalseteks RNAdeks.

2.3.1. ALFAVIIRUSTE TRANS-REPLIKAASIDE AKTIIVSUSEID INIMESE RAKKODES SAAB HINNATE MARKERVALKUDE AKTIIVSUSTE ABIL

HEK293T rakke kotransfekteeriti HSPolI-FG ning sama viiruse replikaasi ekspresseeriva (edaspidi homoloogse) CMV-P1234 plasmiidiga (Joonis 11A). Kõik katses mõõdetud aktiivsused on esitatud normaliseerituna vastavate kontrollide (inaktiivse P1234^{GAA} replikaasi) suhtes, st markervalgu tootmise suurenemise kujul.

Kõikide *trans*-replikaaside, va EILV ning ONNV, replikatsioon ning transkriptsioon toimusid imetajarakkudes efektiivselt. Oodatult ei suutnud sääse-spetsiifiline EILV homoloogilist matriitsi replitseerida ning transkribeerida 37 °C juures, kuid suutis seda teha 28 °C juures (Joonis 11A). See näitab, et vastupidiselt kirjanduses toodud andmetele (Nasar *et al.*, 2014) ei ole EILVi replikatsioon sääse-spetsiifiline. Selle asemel on EILV replikaas tugevalt temperatuuri tundlik, kuid ei vaja toimimiseks sääsest pärinevaid peremees-faktoreid (valke). Teiste replikaasidega võrrelduna jäi ka VEEV replikatsioon suhteliselt madalaks, kuid transkriptsioon toimus väga efektiivselt (Joonis 11A).

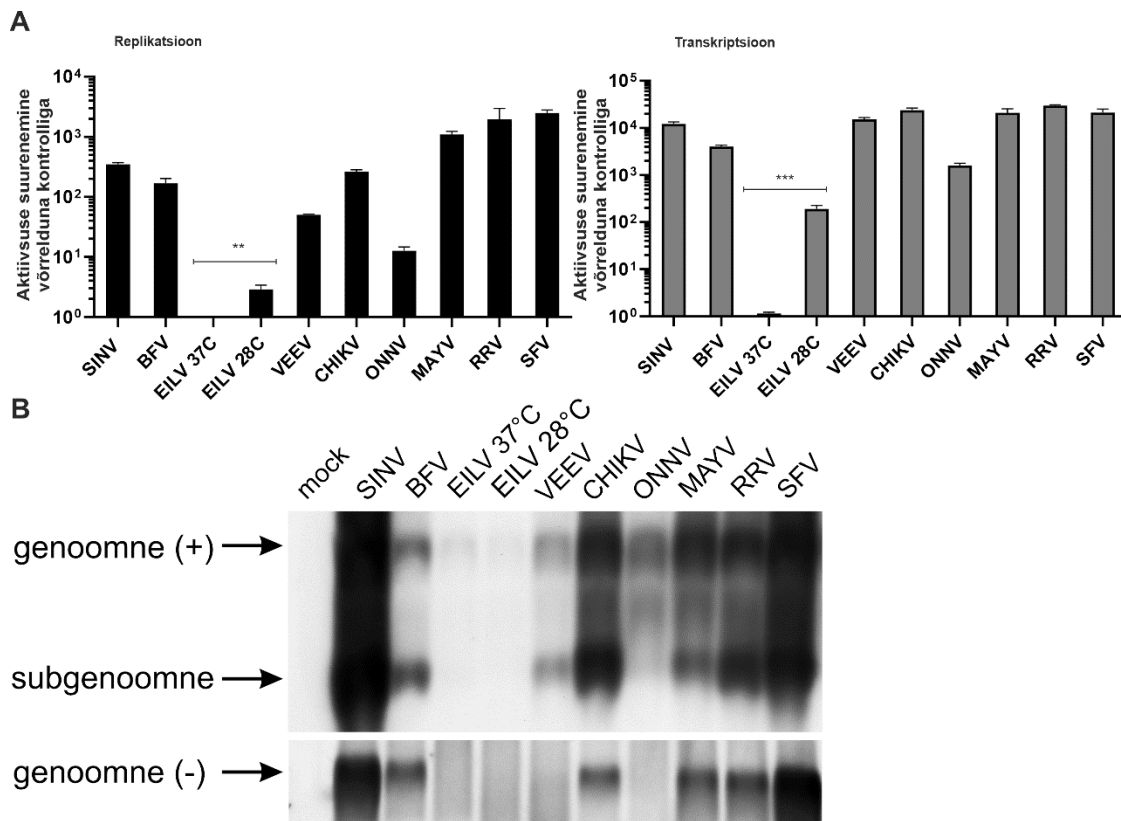
Fülogeneetiline analüüs näitab, et CHIKV ning ONNV on väga lähedases suguluses (Joonis 6). Seega on huvitav, et ONNV replikatsiooni ning transkriptsiooni tasemed on CHIKV omadest palju madalamad. Üks põhjus selleks võib olla ONNV replikaasi madal ekspressioonitase, mida võib põhjustada näiteks haruldane koodonkasutus või krüptilised splaissimise saidid kodeerivas järjestuses. Samas on näidatud, et see ei ole peamine põhjus ja et ONNV replikaasi madal aktiivsus tuleneb hoopis selle viiruse P123 (kuid mitte nsP4) regiooni omadustest (minu avaldamata andmed).

Kinnitamaks, et Fluc ning Gluc markerite abil hinnatud genoomse RNA ning SG RNA tasemed tõesti korreleeruvad viraalse RNA sünteesiga, teostati ka northern blot analüüs (Joonis 11B). Saadud tulemused näitasid, et markergeenide abil kirjeldatud replikatsiooni ning transkriptsiooni tasemed vastavad üldiselt väga hästi viraalse RNA ekspressiooni tasemele (võrdle Joonised 11A-B). EILV puhul jäid genoomse ning SG RNA tasemed nii 28 °C kui ka 37 °C juures allapoole tuvastamise piiri, mis kajastus ka madalates markervalkude aktiivsuste järgi määratud replikatsiooni ning transkriptsiooni tasemetes (võrdle Joonised 11A, B). Lisaks jäi allapoole tuvastamise piiri ka ONNV SG RNA tase, mis oli samuti vastavuses markervalgu aktiivsuse kaudu mõõdetud ONNV transkriptsiooni tasemega. Negatiivse ahela RNA sünteesi ei tuvastatud EILV, VEEV ning ONNV puhul, mis kõigil juhtudel korreleerus vastava *trans*-replikaasi madala replikatsiooni aktiivsusega (võrdle Joonised 11A, B). Kõrgel tasemel esines viraalsete RNAd süntees SINV, BFV, CHIKV, MAYV, RRV ning SFV *trans*-replikaasidel

(Joonis 11B). Kõrgeim replikatsioon tuvastati SINV ning SFV puhul ning sellega oli vastavuses ka northern blot analüüsil tuvastatud kõrge negatiivse RNA ahela sünteesi tase.

Huvitav on see, et kuigi VEEV puhul jäi SG RNA tase madalamaks kui näiteks SINV puhul, olid nende transkriptsiooni aktiivsused Gluc ekspressiooni järgi hinnatuna mõlemal väga kõrged. See näiv vastuolu võis olla tingitud VEEV *trans*-replikaasi eripärast. Vana Maailma alfaviirustel kannavad peamist rolli tsütotoksilisuse tekkimisel nsP2 ning nsP3 valgud (Akhrymuk *et al.*, 2018; Garmashova *et al.*, 2006). Uue Maailma alfaviirustel vastutab selle eest hoopis CP (Garmashova *et al.*, 2007). Kuna VEEV *trans*-replikaas CP valku ei tooda, siis ei toimu VEEV *trans*-replikaasi ekspresseerivas rakus sellist peremehe transkriptsiooni ja translatsiooni maha surumist nagu Vana Maailma viiruste *trans*-replikaase sisaldavate rakkude puhul. Kui rakulist makromolekulide sünteesitegevust alla ei suruta, kaotab *trans*-replikaasi poolt sünteesitud SG RNA translatsioonilise eelise raku mRNAde ees, kuid sellele vaatamata suureneb üldine SG RNA translatsiooni efektiivsus. Nii võib oletada, et VEEV *trans*-replikaasi poolt sünteesitud SG RNAsid on küll rakkudes suhteliselt vähem, kuid neid transleeritakse efektiivsemalt kui Vana Maailma viiruste *trans*-replikaaside poolt sünteesitud SG RNAsid.

Nendest korreleeruvatest *trans*-replikaaside ning viraalse RNA sünteesi analüüsides võib järeldada, et alfaviiruste *trans*-replikaasid on imetajarakkudes aktiivsed. Mitte üllatuslikult jäi ainsaks erandiks EILV, mille puhul küll 28 °C juures transkriptsiooni ja replikatsiooni signaalid tuvastati, kuid need jäid teiste viiruste *trans*-replikaasidega võrreldes siiski madalaks.



Joonis 11. Alfaviiruste *trans*-replikaasid on aktiivsed imetajarakkudes. (A) HEK293T rakke transfekeeriti 96-auguse plaadi formaadis HSPoli-FG matriitside ning neile homoloogiliste CMV-P1234 või CMV-P1234^{GAA} plasmiididega. Transfekeeritud rakke inkubeeriti 18 tundi 37 °C juures, EILV puhul ka 48 tundi 28 °C juures. Seejärel mõõdeti Fluc (replikatsioon, vasak paneel) ning Gluc (transkriptsioon, parem paneel) markergeenide ekspressioon. Aktiivseid replikaase sisaldavatest rakkudest mõõdetud aktiivsused normaliseeriti matriitsidele vastavaid P1234^{GAA} ekspresiooniplasmiide sisaldanud rakkudest saadud aktiivsuste vastu. Tulbad näitavad keskväärtuseid. Need ning standardviga on arvutatud kolme iseseisva katse andmete põhjal. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; (B) HEK293T rakke transfekeeriti 6-auguse plaadi formaadis ning inkubeeriti vastavalt (A) paneelis kirjeldatule. Inkubatsiooni järgselt eraldati totaalne RNA, mida analüüsiti northern blot meetodil. Joonisel on välja toodud negatiivse RNA ja positiivsete genoomse RNA ning SG RNA sünteeseid.

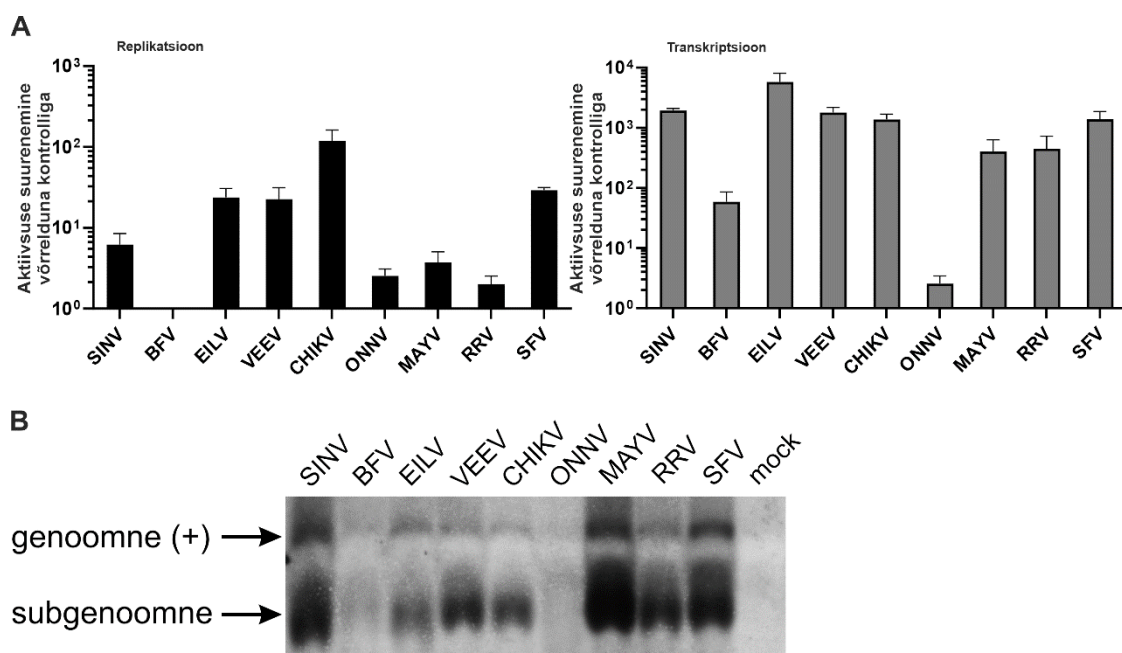
2.3.2. ALFAVIIRUSTE *TRANS*-REPLIKAASIDE AKTIIVSUSED *Aedes albopictus* RAKKUTES ON VÄIKSEMAD KUI INIMESE RAKKUTES

C6/36 rakke kotransfekeeriti AlbPolII-FG ning neile homoloogiliste Ubi-P1234 ekspresiooniplasmiididega (Joonis 12A). Katse korraldati ning mõõdetud aktiivsuseid analüüsiti nagu on kirjeldatud lõigus 2.3.1. Esimese tulemusena saab välja tuua, et sääse rakkudes olid kõikide *trans*-replikaaside (va EILV) aktiivsused madalamad kui inimese rakkudes (võrdle Joonised 11A ja 12A). Kui inimese rakkudes jäid Fluc ja Gluc aktiivsuste tõesud enamasti vastavalt 100-1000 ning 10000 kordseks (Joonis 11A), siis *Aedes albopictus* rakkudes jäid need enamasti vastavalt 10 ning 1000 kordseks (Joonis 12A). Selline vahe oli

tingitud enam kui kümne kordest vahest reporterite aktiivsuses P1234 replikaaside juuresolekul. Reporterite aktiivsused P1234^{GAA} juures olekul (foon) olid mõlemas rakutüübis sarnased.

EILV, mille *trans*-replikaas oli C6/36 rakkudes aktiivsem kui inimese rakkudes, on töös kasutatud viiruste hulgas ainus sääse-spetsiifiline viirus. Seetõttu oli tulemus, et EILV replikaas suudab sääse rakkudes matriitsi kõige efektiivsemalt replitseerida ning transkribeerida oodatud (Joonis 12A). Kuigi madalamat aktiivsust (võrreldes inimese rakkudega) näitasid C6/36 rakkudes üles kõik ülejäänud *trans*-replikaasid, tuleb nende hulgast eraldi välja tuua BFV ning ONNV *trans*-replikaasid. BFV *trans*-replikaas näitas sääse rakkudes suhteliselt madalat transkriptsioonilist aktiivsust ning ka replikatsioon jäi alla tuvastamise piiri (st P1234 replikaasi aktiivsus ei ületanud P1234^{GAA} oma). ONNV *trans*-replikaasi mõlemad aktiivsused olid aga niivõrd madalad, et seda võib *Aedes albopictus* rakkudes lugeda praktiliselt inaktiivseks. Nii BFV kui ka ONNV puhul võib saadud tulemus kajastada viiruste vektorkasutust: BFV kandub edasi enamasti kasutades mitte *Aedes albopictus* sääski, vaid *Culex annulirostris* või *Aedes vigilax* sääski ning ONNV looduslikeks vektoriteks on hoopis *Anopheles* sääsed (Kizu *et al.*, 2019; Naish *et al.*, 2011; Powers *et al.*, 2000). Seega on väga tõenäoline, et nende viiruste puhul on tegemist sääseliigi spetsiifilise defektiga. Seda oletust toetab ka asjaolu, et suhteliselt madalat replikatsiooni täheldati ka MAYV ning RRV puhul, mille tavapäraseks vektoriks pole samuti *Aedes albopictus* sääsed. RRV levib, nagu ka BFV, peamiselt *Culex annulirostris* ning *Aedes vigilax* sääskede abil (Harley *et al.*, 2001). MAYV reservuaariks ning peamiseks vektoriks peetakse aga *Haemagogus* liiki sääski (Ali *et al.*, 2019). Seega võib mõnede alfaviiruste *trans*-replikaaside madalaid aktiivsuseid *Aedes albopictus* rakkudes vähemalt osaliselt põhjendada vastavate viiruste erinevate vektorite spetsiifilisusega.

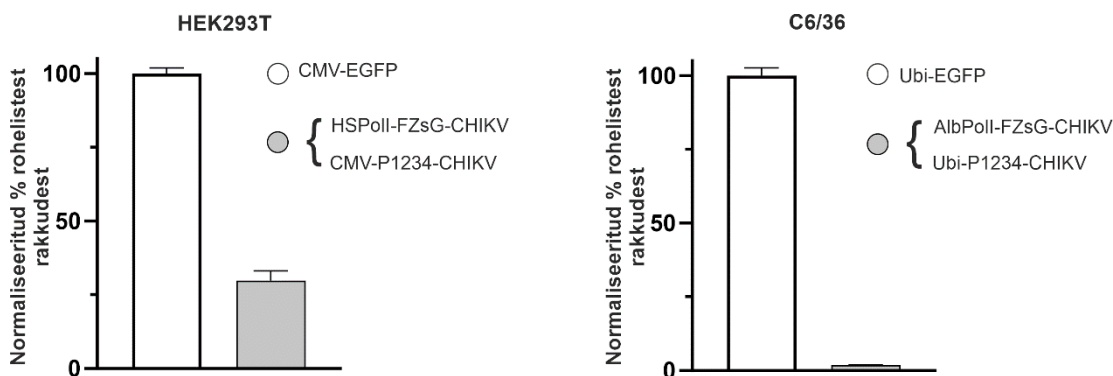
Viraalse RNA sünteesi analüüs northern blot meetodil näitas, et SG RNAd süntees oli tuvastatav kõigil viirustel, va ONNV puhul, ning BFV puhul toimus see madalal tasemel. Seega korreleeruvad northern blot ja Gluc aktiivsuste kaudu hinnatud transkriptsiooni aktiivsused omavahel hästi (võrdle Joonised 12A, B). Genoomse RNA sünteesi puhul see nii aga ei olnud. Northern blot järgi näitasid kõrgeimat genoomse RNA taset SINV ning MAYV, samas kui Fluc ekspressioon jäi nende *trans*-replikaaside puhul väga madalaks. Sama täheldati ka RRV puhul, mille madal Fluc aktivatsioon viraalse genoomse RNA tasemega ei korreleerunud. Tõenäoliselt ei ole siin tegemist antud sääseliigi rakkude spetsiifilise fenomeniga, vaid efekt tuleneb pigem lihtsalt madalast markeri aktivatsioonist. Seega ei pruugi Fluc marker *Aedes albopictus* rakkudes alati sobida genoomse RNA replikatsiooni iseloomustamiseks. Samas pakuvad madalamad Fluc signaalid võimalust uurida alfaviiruste replikatsiooni aktiivsust suurendavaid efekte (mutatsioonid, peremeesfaktorid jne).



Joonis 12. Enamike uuritud alfaviiruste *trans*-replikaasid on aktiivsed *Aedes albopictus* rakkudes. (A) C6/36 rakke transfekteriti 96-auguse plaadi formaadis AlbPolI-FG matriitsite ning neile homoloogiliste Ubi-P1234 või Ubi-P1234^{GAA} plasmiididega. C6/36 rakke inkubeeriti transfektsiooni järgselt 48 tundi 28 °C juures. Seejärel mõõdeti Fluc markergeeni ekspressioon (vasak paneel) ning Gluc markergeeni ekspressioon (parem paneel). Tulemused on analüüsitud ja esitatud nagu on kirjeldatud Joonis 11 legendis. (B) C6/36 rakke transfekteriti 6-auguse plaadi formaadis ning inkubeeriti vastavalt (A) paneelis kirjeldatule. Inkubatsiooni järgselt eraldati totaalne RNA, mida analüüsiti northern blot meetodil. Joonisel on noolega märgitud positiivne genoomne RNA ning SG RNA.

Sarnaselt meie uurimisgrupis eelnevalt avaldatule (Utt *et al.*, 2019), ei tuvastatud ka selles töös sääse rakkudes negatiivse RNA ahela sünteesi. See ning eelnevalt mainitud madalamad markervalkude aktiivsused viitavad asjaolule, et *trans*-replikaasi süsteem on sääse rakkudes vähem efektiivne kui inimese rakkudes. Uurimaks, millest selline väiksem efektiivsus tuleneb, viidi läbi katse võrdlemaks *trans*-replikaasi süsteemide efektiivsuseid nende rakutüüpide vahel. Selleks transfekteriti esmalt C6/36 ning HEK293T rakuliine vastavalt Ubi-EGFP ning CMV-EGFP ekspressiooniplasmiididega (Joonis 13). Transfekteritud HEK293T rakkude hulgas tuvastati tunduvalt rohkem EGFP positiivseid rakke (~66%) kui C6/36 rakkude seas (~26%). See näitab, et transfekterimise efektiivsus on C6/36 rakkude puhul enam kui kaks korda madalam kui HEK293T rakkude puhul. Järgnevalt kotransfekteriti HEK293T rakke HSPolI-FZsG-CHIKV ning CMV-P1234-CHIKV plasmiididega ja C6/36 rakke AlbPolI-FZsG-CHIKV ning Ubi-P1234-CHIKV plasmiididega. Transfekteritud HEK293T rakkude seas tuvastati ~20% ZsGreen positiivseid rakke, kuid transfekteritud C6/36 rakkude seas oli neid vaid ~0,5%, seega oli vahe ligikaudu 40ne kordne. Samas, ZsGreen markervalgu ekspressioonitasemed olid replikatsiooni-positiivsetes inimese ja sääse rakkudes sarnased.

Sellest saab järeldada, et üksikus C6/36 rakus ei ole replikatsiooni aktiivsus väiksem kui üksikus inimese rakus. Vahe rakuliinide vahel tuleneb peamiselt sellest, et rakkude arv, kus replikatsiooni alustatakse, on C6/36 rakkude puhul oluliselt väiksem kui HEK293T rakkude puhul. Võttes arvesse ka HEK293T ning C6/36 rakkude erinevaid transfektsiooni efektiivsuseid, leiti, et hinnanguliselt käivitatakse replikatsiooni edukalt ~29% transfekteeeritud HEK293T rakkudes, samal ajal, kui C6/36 rakkudes on vastav näitaja vaid ~1,9% (Joonis 13).



Joonis 13. CHIKV replikaas käivitab RNA replikatsiooni HEK293T ning C6/36 rakkudes erineva efektiivsusega. HEK293T rakke (vasakpoolne paneel) transfekteeeriti positiivseks kontrolliks CMV-EGFP ekspressiooniplasmiidiga. Lisaks kotransfekteeeriti HEK293T rakke HSPoli-FZsG-CHIKV ning CMV-P1234-CHIKV ekspressiooniplasmiididega. C6/36 rakke (parempoolne paneel) transfekteeeriti positiivseks kontrolliks Ubi-EGFP ekspressiooniplasmiidiga. Lisaks kotransfekteeeriti C6/36 rakke AlbPoli-FZsG-CHIKV ning Ubi-P1234-CHIKV ekspressiooniplasmiididega. Rakud koguti kas 18 (HEK293T) või 48 (C6/36) tundi peale transfektsiooni. Rohelist markerit ekspresseerivate rakkude hulka analüüsiti Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer abil. Mõlemal paneelil võeti EGFPd ekspresseerivate rakkude arv võrdseks 100%ga ning ZsGreen markerit ekspresseerivate rakkude % on toodud proportsioonis EGFPd ekspresseerivatest rakkudest.

2.3.3. SFV KOMPLEKSI KUULUVATE VIIRUSTE REPLIKAASID ON INIMESE RAKKODES VÕIMELISED EFEKTIIVSELT RISTKASUTAMA KOMPLEKSI KUULUVATE JA KOMPLEKSI VÄLISTE VIIRUSTE MATRIITS-RNAsid

Juba eelnevates uurimustes on tuvastatud asümmeetrilist käitumist alfaviiruste replikaaside ning matriitsite vahel. Nii suudavad näiteks CHIKV ning RRV replikaasid efektiivselt replitseerida SINV matriits-RNAd, kuid SINV replikaas CHIKV ja RRV matriitse efektiivselt ei kasuta (autori bakalaureusetöö). See on tekitanud küsimuse, et millest tuleneb erinevate alfaviiruste replikaaside võimekus heteroloogilisi matriitse kasutada. Käesoleva töö jooksul on meie laboris erinevate uurimisprojektide raames konstrueeritud hulk alfaviiruste *trans*-replikatsiooni süsteeme. See võimaldas põhjalikult uurida RNA matriitside ristikasutamist alfaviiruse replikaaside poolt. Matriitside ning replikaaside ristikasutamise uurimiseks oli vaja rakke transfekteeerida replikaasi ekspressiooniplasmiidiga ning sama viiruse matriitsiga või siis

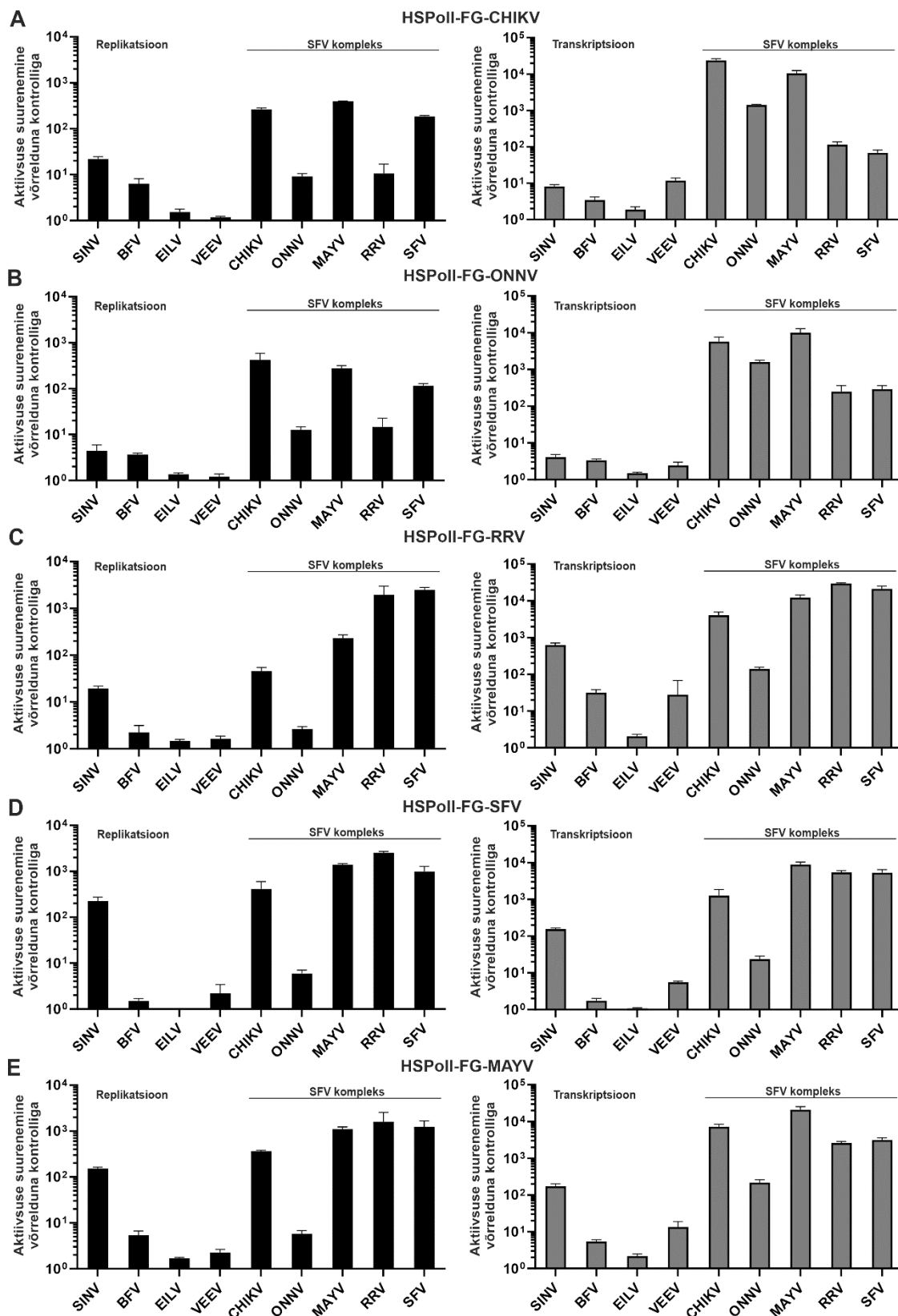
teise alfaviiruse matriitsiga (edaspidi „heteroloogiline matriits“). Analüüsil kasutatud replikaaside ja matriitside suur hulk ja mitmekesisus võimaldas esmakordselt põhjalikult uurida heteroloogiliste matriitside kasutamist alfaviiruste replikaaside poolt. Töös kasutatud üheksa viiruse puhul tuvastati hulgaliselt matriitside efektiivset ristkasutamist. Kuna tuvastati olulisi erinevusi SFV kompleksi kuuluvate ning välisgruppi kuuluvate viiruste vahel on andmed allpool esitatud nende komplekside kaupa.

SFV kompleksi viiruste matriits-RNAde kasutamine on inimese rakkudes kompleks-spetsiifiline: SFV kompleksi kuuluvate viiruste matriitsidel esines silmapaistev eelistus SFV kompleksi kuuluvate replikaaside suhtes. Kompleksi kuuluvate viiruste replikaasid ristkasutasid reeglina efektiivselt üksteise RNA matriitse, samas, kui välisgrupi viiruste replikaasid neid matriits-RNAsid replitseerida ega transkribeerida ei suutnud. Märkimisväärne oli ka see, et SFV kompleksi kuuluvate viiruste replikaasidel esines korrelatsioon matriitsi eelistuse ja viiruste fülogeneetilise läheduse vahel – ühte gruppi liigitusid CHIKV ning ONNV matriitsid ning teise gruppi RRV, SFV ning MAYV matriitsid. CHIKV ning ONNV matriitse replitseerisid väga efektiivselt CHIKV, MAYV ning SFV replikaasid (võrdle Joonised 14A-B). Transkriptsiooni puhul tõusid esile CHIKV, ONNV ning MAYV replikaasid, samal ajal, kui RRV ning SFV replikaaside aktiivsused jäid mõnevõrra madalamale tasemele (võrdle Joonised 14A-B).

Fülogeneetilise analüüsi järgi on SFV ning MAYV lähedalt suguluses (Joonis 6). Sarnaselt CHIKV ning ONNVle ilmnes ka SFV ning MAYV puhul seos replikaaside ning matriitside käitumises. Mõlemat matriitsi kasutasid kõrge efektiivsusega CHIKV, MAYV, RRV ning SFV replikaasid (võrdle Joonised 14D-E). Huvitaval kombel replitseeris nii SFV kui ka MAYV matriitse kõige paremini RRV replikaas, kuid ka homoloogiliste replikaaside aktiivsused olid sellega sarnased. MAYV ning SFV matriitside transkriptsioonil osutus kõige aktiivsemaks MAYV replikaas. Ka RRV matriits käitus SFV ja MAYV matriitsidele sarnaselt (Joonis 14C). RRV matriitsi replitseerisid kõrge efektiivsusega nii homoloogiline replikaas kui ka SFV ja MAYV replikaasid, samas, kui CHIKV replikaasi aktiivsus jäi tagasihoidlikuks. RRV, SFV ning MAYV matriitse ei suutnud SFV kompleksi viirustest efektiivsel tasemel replitseerida ning transkribeerida ainult ONNV replikaas. Tõenäoliselt ei tulene see ainult ONNV replikaasi matriitsi eelistusest, vaid kajastab ka selle replikaasi suhteliselt väikest aktiivsust inimese rakkudes. Nii on näha, et isegi homoloogilisel matriitsil on ONNV replikaasi efektiivsus selgelt väiksem CHIKV ja MAYV (replikatsiooni puhul ka SFV) replikaaside omast (Joonis 14B).

Seega, üldpilt on SFV kompleksi kuuluvate viiruste puhul sarnane: kõigi viie viiruse replikaasid on võimelised üksteise matriitse kasutama, samas, kui välisgrupi viiruste replikaasid

SFV kompleksi matriitse võrreldava efektiivsusega replitseerida ega transkribeerida ei suutnud. Teatud erandiks sellest reegilist osutus SINV replikaas, mis replitseeris arvestatava efektiivsusega SFV ja MAYV matriitse ning transkribeeris lisaks neile kahele veel ka RRV matriitsi (Joonis 14). Kõiki neid andmeid arvestades saab järeldada, et CHIKV ning ONNV matriitsid liigituvad selgelt ühte gruppi: neid matriitse suudavad kõrgel efektiivsusega kasutada CHIKV ja MAYV replikaasid, SFV ja RRV replikaasid töötavad nõrgemal aktiivsusel ning välisgrupi replikaasid peaaegu üldse mitte (Joonised 14A-B). Teise gruppi liigitusid SFV, MAYV ning RRV matriitsid, kus kõrgem eelistus oli MAYV, RRV ning SFV replikaaside suhtes ja mida suutis välisgrupi replikaasidest suheteliselt hästi kasutada SINV replikaas (Joonised 14C-E).

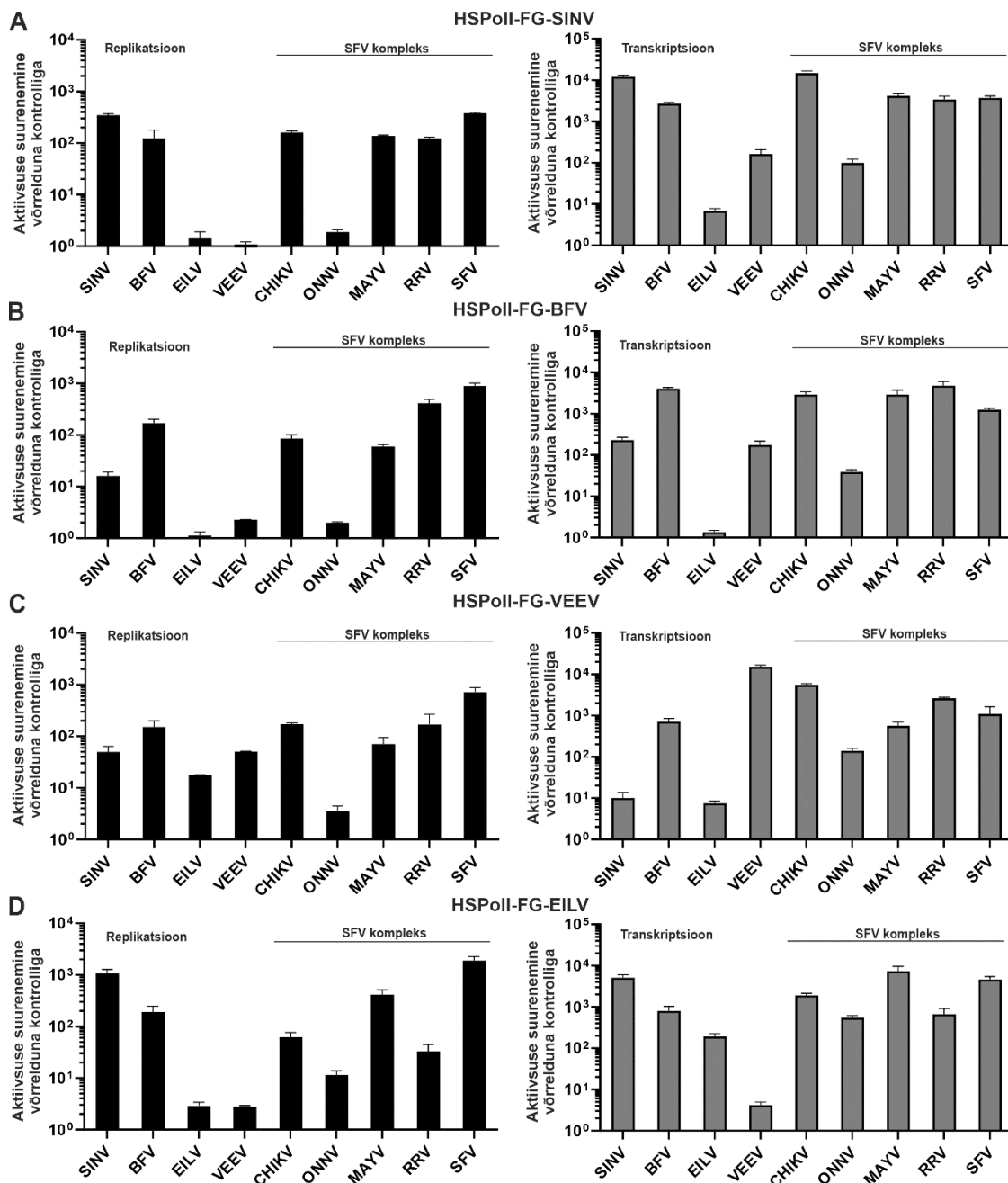


Joonis 14. SFV kompleksi kuuluvate viiruste matriits-RNAde ristkasutamine inimese rakkudes. HEK293T rakke transfecteeriti X-teljel toodud üheksa erineva CMV-P1234 ning (A) HSPoII-FG-CHIKV, (B) HSPoII-FG-ONNV, (C) HSPoII-FG-RRV, (D) HSPoII-FG-SFV ja (E) HSPoII-FG-MAYV ekspressiooniplasmiididega; Kontrollina kasutati HSPoII-FG ning CMV-P1234^{GAA} ekspressiooniplasmiide. 18 tundi peale transfectsiooni (EILV replikaasi puhul 48 tundi peale transfectsiooni, inkubeerimine 28 °C) rakud lüüsiiti ja seejärel mõõdeti Fluc (vasak paneel) ning Gluc (parem paneel) markervalkude aktiivsused. Tulemused normaliseeriti vastava CMV-

P1234^{GAA} ekspressiooniplasmiidiga transfekteeritud rakkudest mõõdetud aktiivsustele. Tulbad näitavad keskväärtuseid. Need ning standardviga on arvutatud kolme iseseisva katse andmete põhjal.

SFV kompleksi kuuluvate viiruste replikaasid kasutavad inimese rakkudes efektiivselt välisgruppi kuuluvate viiruste matriits-RNAsid: Välisgrupi viiruste matriitside kasutamine erines SFV kompleksi kuuluvate viiruste matriitside kasutamisest suurema universaalsuse poolest (Joonis 15). SINV replikaas replitseeris ja transkribeeris hästi homoloogilist matriitsi. Sarnasel efektiivsusel töötasid SINV matriitsil ka BFV, CHIKV, MAYV, RRV ja SFV replikaasid. Replikatsioonil ei andnud peaaegu mingisugust efektiivsust EILV, VEEV ning ONNV replikaasid, kuid transkriptsioonil olid VEEV ning ONNV replikaaside aktiivsused märgatavad (Joonis 15A). SINV matriitsile käitus sarnaselt ka BFV matriits (Joonis 15B). VEEV matriits erines SINV ning BFV matriitsidest ainult selle poolest, et seda replitseeris ning transkribeeris efektiivselt VEEV (homoloogiline) replikaas, mis teisi matriitse ei kasutanud (Joonis 15C). Üllatuslikult selgus, et sääse-spetsiifiline EILV matriits oli erinevate replikaaside poolt laialdaselt kasutatav (Joonis 15D).

Vaadates kõiki välisgrupi viiruste kohta saadud andmeid tervikuna võib järeldada, et neid viiruseid iseloomustab selge asümmeetria. Ühest küljest ei esinenud selle grupi viiruste matriitsidel tugevat eelistust kindlate replikaaside suhtes ja nende matriitside kasutamine oli palju universaalsem, kui seda täheldati SFV kompleksi kuuluvate viiruste matriitside puhul. Teisest küljest eelistasid välisgruppi kuuluvate viiruste replikaasid selgelt homoloogilisi matriitse ja olid sageli võimetud matriitside ristkasutamiseks. Eranditeks viimasest reeglist olid BFV replikaas, mis replitseeris hästi kõiki välisgrupi viiruste matriitse ja SINV replikaas, mis oli väga efektiivne EILV matriitsil ning suutis küllaltki efektiivselt replitseerida ka SFV ja MAYV matriitse (võrdle Joonised 14 ja 15, kokkuvõtvalt esitatud ka Lisas 1, Supporting Figure 5).

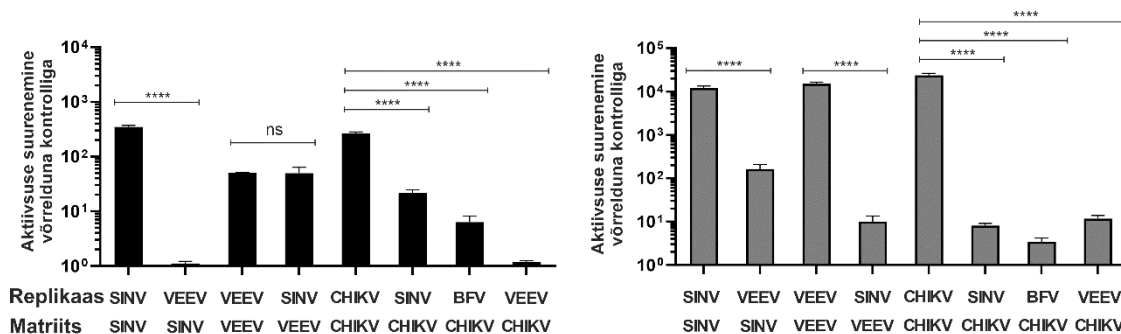


Joonis 15. Välisgruppi kuuluvate matriits-RNAde ristikasutamine inimese rakkudes. HEK293T rakke transfecteeriti X-teljel toodud üheksa erineva CMV-P1234 ning (A) HSPolII-FG-SINV, (B) HSPolII-FG-BFV, (C) HSPolII-FG-VEEV ja (D) HSPolII-FG-EILV ekspressiooniplasmiididega. Kontrollina kasutati HSPolII-FG ning CMV-P1234^{GAA} ekspressiooniplasmiide. Katse viidi läbi, tulemused analüüsiti ja on esitatud nagu seda on kirjeldatud Joonis 14 legendis.

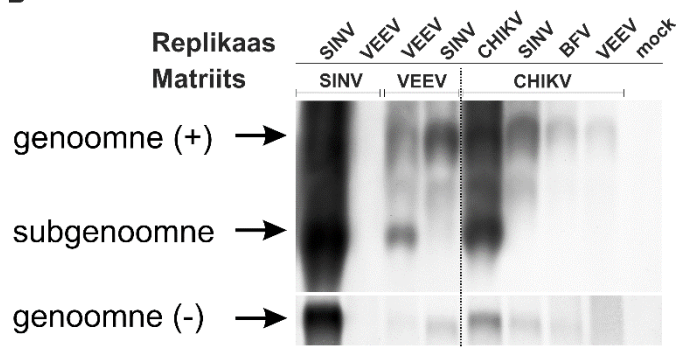
Matriits-RNA/repliikaas kombinatsioonide poolt ekspresseeritud markerite efektiivsus korreleerub viraalse RNA tasemetega: Uurimaks lähemalt teatud matriitside ning replikaaside kombinatsioonide kokkusobimatuse põhjuseid, viidi läbi viraalse RNA analüüs northern blot meetodil (Joonis 16B). Positiivsete kontrollidena kasutati välisgrupist SINV ja VEEV replikaase ning SFV kompleksist CHIKV replikaasi koos nende homoloogiliste matriitsidega. Nendega võrreldi heteroloogilisi kombinatsioone, mille puhul matriitsi

replitseerimine ja/või transkribeerimine ei olnud efektiivne. Esiteks võrreldi kombinatsioone SINV ning VEEV matriitsidest ja replikaasidest ning teiseks kombinatsioone CHIKV matriitsist ja SINV, BFV ning VEEV replikaasidest (Joonis 16A).

A



B



Joonis 16. Kokkusobimatud matriitside ning replikaaside kombinatsioonid on ebaefektiivsed ka viraalse RNA sünteesil. (A) Näidatud replikaas/matriits kombinatsioonide replikatsiooni ja transkriptsiooni efektiivsused hinnatuna toodetud markervalkude aktiivsuste põhjal. Tulemused on üle kantud Joonistelt 14 ja 15 ning neile on lisatud statistilise analüüsi tulemused. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; ns – mitte oluline (not significant). **(B)** HEK293T rakke transfecteeriti 6-auguse plaadis formaadis ning inkubeeriti ja analüüsiti nagu on kirjeldatud Joonis 11B legendis. Joonisel on välja toodud negatiivse ning positiivse genoomse RNA ning SG RNA süntees.

Nagu on näha Jooniselt 16, korreleerus viraalse RNA süntees täielikult mõõdetud markervalkude aktiivsustega. Northern blot tulemused kinnitasid, et VEEV replikaas ei ole võimeline SINV matriitsi kasutama ja ühtegi viraalset RNAd leida ei õnnestunud (Joonis 16B). See näitab, et defekt esineb juba negatiivse RNA sünteesi tasemel. See defekt ei ole sümmeetriline, sest SINV replikaas oli selgelt võimeline VEEV matriitsilt negatiivset RNAd sünteesima. SINV replikaas + VEEV matriits kombinatsiooni puhul tuvastati ka positiivse genoomse RNA sünteesi, samas kui SG RNA ekspressioon jäi alla poole detektsiooni piiri (Joonis 16B). Need tulemused näitavad, et SINV replikaas on võimeline VEEV matriits-RNAd replitseerima, kuid mitte transkribeerima. CHIKV (SFV kompleksi esindaja) matriitsi ning välisgrupi viirustelt pärinevate replikaaside kombinatsioonide puhul tuvastati, et SINV replikaas suutis CHIKV matriitsi replitseerida nõrgal efektiivsusel. BFV replikaasi puhul täheldati väga nõrka negatiivse RNA sünteesi, VEEV puhul selget signaali tuvastada ei

õnnestunud. Positiivse genoomse RNA signaalid olid mõlemal juhul väga madalad. SG RNA hulgad jäid kõigi kolme replikaasi puhul alla määramise piiri ning ükski mainitud replikaasidest CHIKV matriitsi transkribeerida ei suutnud (Joonis 16B). Positiivsete RNA ahelate mõõtmise tulemused kattusid täielikult markervalkude aktiivsuste mõõtmise tulemustega (võrdle Joonised 16A-B). Asjaolu, et enamiku üleval kirjeldatud kombinatsioonide puhul oli tuvastatav nõrk genoomse RNA tase, kuid SG RNA tase jäi allapoole analüüsi tundlikkuse piiri, viitab sellele, et analüüsitud alfaviiruste SG promootoritel esineb tugev replikaasi spetsiifilisus.

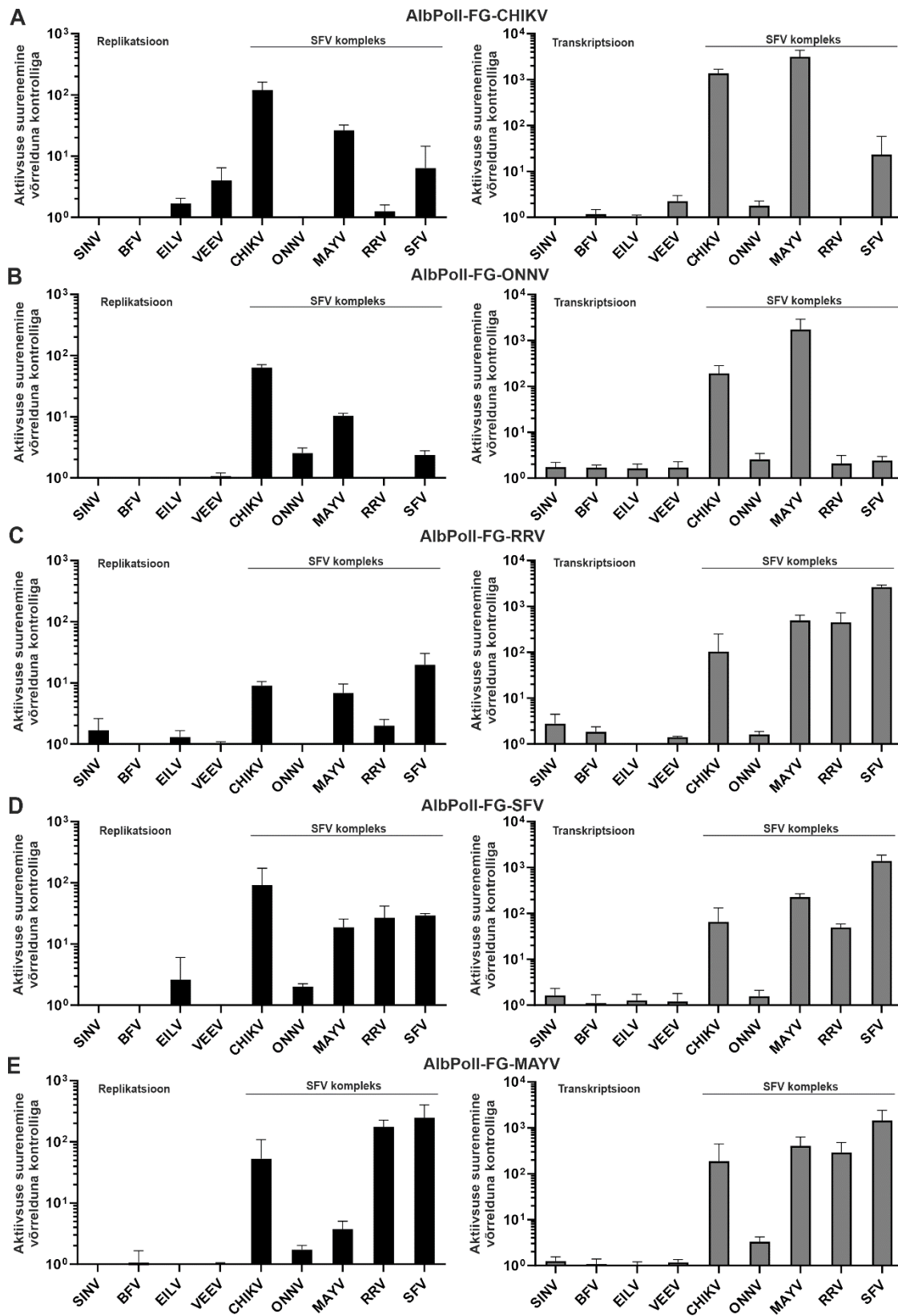
2.3.4. ALFAVIIRUSTE MATRIITSIDE RISTKASUTAMINE *AEDES ALBOPICTUS* RAKKODES SARNENE NENDE RISTKASUTAMISELE INIMISE RAKKODES

Eelnevad uuringud on näidanud, et alfaviiruste genoomse RNA *cis*-aktiivsed elemendid ning sekundaarstruktuurid täidavad selgroogsete peremees- ja vektorputukarakkudes erinevaid ülesandeid (Fayzulin ja Frolov, 2004; Kendall *et al.*, 2019; Morley *et al.*, 2018). Seetõttu uuriti järgnevalt kõikide matriitside ristkasutamist *Aedes albopictus* rakkudes. Selleks transfecteeriti C6/36 rakke homoloogiliste ja heteroloogiliste AlbPolI-FG ning Ubi-P1234 ekspressiooniplasmiidide kombinatsioonidega.

Saadud tulemuste analüüs tõi välja, et sääse rakkudes oli SFV kompleksi kuuluvate viiruste matriitside ristkasutamine üldpildis sarnane nende ristkasutamisele inimese rakkudes (Joonis 17). SFV kompleksi viiruste matriitse suutsid replitseerida ning transkribeerida ainult SFV kompleksi kuuluvate viiruste replikaasid. Võrrelduna olukorraga inimese rakkudes, oli matriitside kasutamise efektiivsus madalam ja selektiivsus mõnevõrra kõrgem.

Sarnaselt inimese rakkudes nähtule replitseerisid ning transkribeerisid CHIKV ning ONNV matriitse hästi CHIKV, MAYV ning SFV replikaasid, aga mitte RRV ning ONNV replikaasid (Joonised 17A-B). Üheks kõige olulisemaks erinevuseks inimese ning *Aedes albopictus* rakkude vahel oligi see, et sarnaselt omaenese matriitsile ei suutnud ONNV replikaas kasutada ka ühtegi teist matriitsi: replikatsiooni tase jäi alati alla tuvastamise piiri ja ka transkriptsiooni puhul jäi aktiivsus tuvastamise piiri lähedale. Nagu ülal näidatud (Joonis 13), iseloomustab *Aedes albopictus* rakke inimese rakkudega võrrelduna ligikaudu 15 korda madalam *trans*-replikatsiooni initsiatsioon. Siiski on erinevus ONNV replikaasi aktiivsuste vahel inimese ja *Aedes albopictus* rakkudes liiga suur, et olla põhjustatud ainult *trans*-replikaasi süsteemi erinevast tõhusest. Seetõttu on põhjust arvata, et tegu on ONNV eripäraga. Põhjusel, et ONNV matriitsi erinevate SFV kompleksi kuuluvate viiruste replikaaside poolt kasutatakse, seisneb ONNV eripära just replikaasis, mitte matriits-RNAs (Joonis 17B).

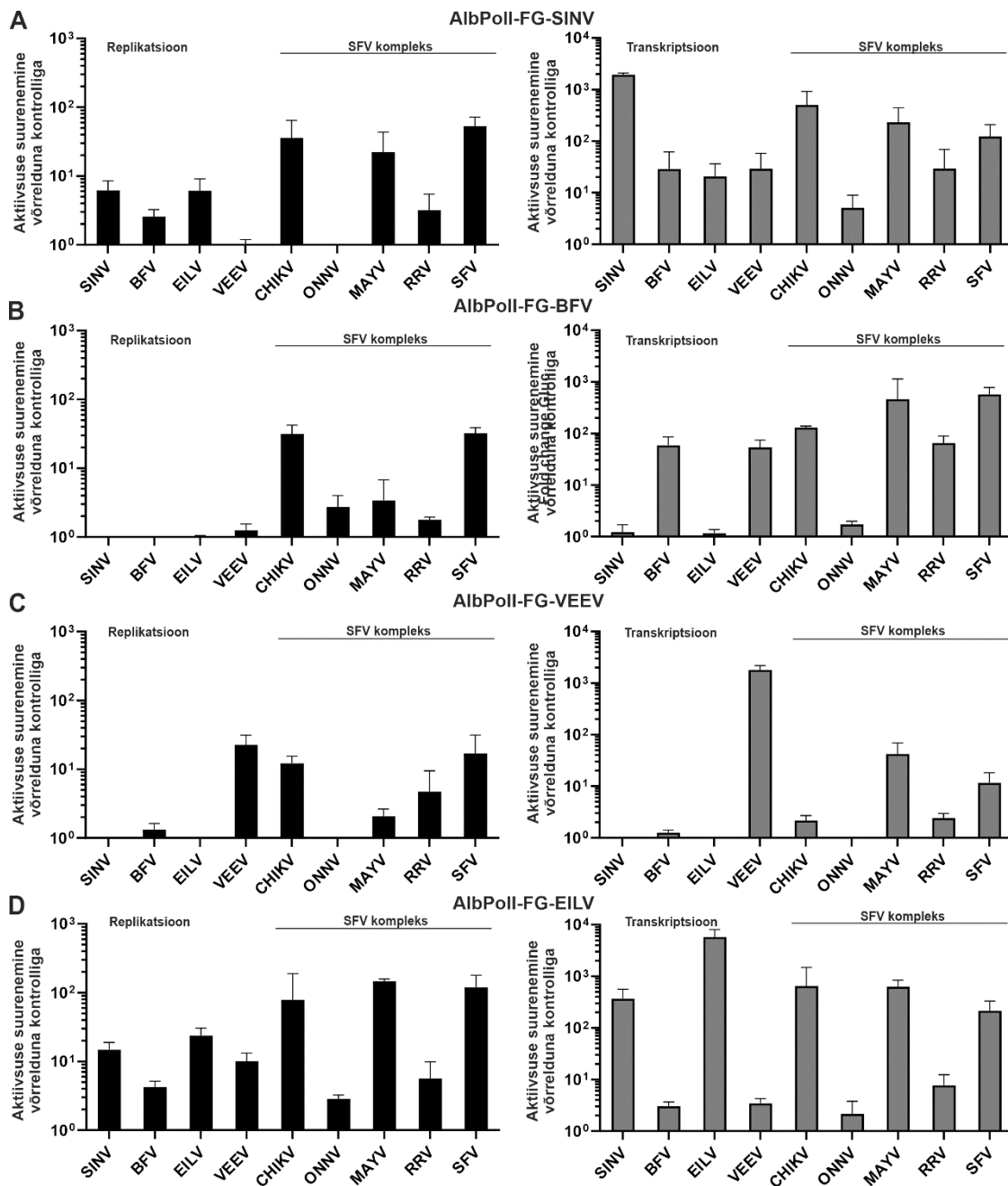
Analoogselt inimese rakkudes nähtule, moodustasid *trans*-replikaaside matriitsid sarnase käitumisega gruppe ka *Aedes albopictus* rakkudes – taas kuulusid ühte gruppi CHIKV ning ONNV matriitsid ning teise RRV, SFV ning MAYV matriitsid. Seega võib järeldada, et SFV kompleksi kuuluvate viiruste replikaaside matriitsi spetsiifilisus on peremeesraku tüübist üsna sõltumatu.



Joonis 17. SFV kompleksi kuuluvate viiruste matriits-RNAde riskasutamine *Aedes albopictus* rakkudes. C6/36 rakke transfekeeriti X-teljel toodud üheksa erineva Ubi-P1234 ning (A) AlbPolI-FG-CHIKV, (B) AlbPolI-FG-ONNV, (C) AlbPolI-FG-RRV, (D) AlbPolI-FG-SFV ja (E) AlbPolI-FG-MAYV ekspressiooniplasmiididega; Kontrollina kasutati AlbPolI-FG ning Ubi-P1234^{GAA} ekspressiooniplasmiide. 48 tundi peale transfektsiooni rakud lüüsiiti ja seejärel mõõdeti Fluc (vasak paneel) ning Gluc (parem paneel) markervalkude aktiivsused. Tulemused

normaliseeriti vastava Ubi-P1234^{GAA} ekspressiooniplasmiidiga transfekteeritud rakkudest mõõdetud aktiivsustele. Tulbad näitavad keskväärtuseid. Need ning standardviga on arvutatud kolme iseseisva katse andmete põhjal.

Välisgrupi viiruste puhul replitseeriti ning transkribeeriti *Aedes albopictus* rakkudes kõige laialdasemalt SINV ning EILV matriitse (Joonised 18A ja 18D). Replikatsioonil kasutasid kõik replikaasid paremini EILV matriitsi kui SINV oma. Kui SINV matriitsi ei replitseerinud ainsana (peale *Aedes* rakkudes mitteaktiivse ONNV replikaasi) VEEV replikaas, siis EILV matriitsil oli selle aktiivsus kõrgem (võrdle Joonised 18A ja 18D). EILV matriitsi transkribeeris oodatult kõige paremini homoloogiline replikaas ning kõrgel efektiivsusel ka SINV, CHIKV, MAYV ja SFV replikaasid. Väga madalal tasemel transkribeerisid EILV matriitsi ka VEEV, BFV ning RRV replikaasid (Joonis 18D). SINV matriitsi transkribeeris kõige paremini tema homoloogiline replikaas. Efektiivselt kasutasid seda ka CHIKV, MAYV ning SFV replikaasid ja madalamal tasemel toimus transkriptsioon BFV, VEEV, EILV ning RRV replikaaside poolt. Seega, SINV ning EILV matriitsite replikatsioonil ning transkriptsioonil ilmneseid teatud sarnasused: mõlemat matriitsi replitseerisid ning transkribeerisid efektiivselt ühed ja samad SFV kompleksi viiruste (CHIKV, MAYV ning SFV) replikaasid. Nii võib EILV ja SINV matriitse pidada C6/36 rakkudes kõige universaalsemateks. Nendega võrrelduna toimus BFV ning VEEV matriitside replikatsioon ning transkriptsioon kesisemal tasemel. BFV matriitsi suutsid replitseerida madalal tasemel ainult SFV kompleksi kuuluvate viiruste replikaasid (Joonis 18B), samal ajal, kui BFV enda replikaasi aktiivsus jäi tuvastamise piirist allapoole. Transkriptsiooni puhul oli homoloogilise replikaasi aktiivsus küll hästi määratav, kuid jäi siiski alla CHIKV, MAYV ning SFV replikaaside omale (Joonis 18B). VEEV matriitsi replitseeris nõrgal tasemel homoloogiline replikaas ning CHIKV, RRV ja SFV replikaasid (Joonis 18C). Transkriptsioonil kasutas VEEV matriitsi väga efektiivselt vaid homoloogiline replikaas ning madalal tasemel toimus transkriptsioon ka MAYV ning SFV replikaasidega (Joonise 18C).



Joonis 18. Välisgrupi viiruste matriits-RNAd ristkasutamine *Aedes albopictus* rakkudes. C6/36 rakke transfecteeriti X-teljel toodud üheksa erineva Ubi-P1234 ning (A) AlbPolI-FG-SINV, (B) AlbPolI-FG-BFV, (C) AlbPolI-FG-VEEV ja (D) AlbPolI-FG-EILV ekspressiooniplasmiididega; Kontrollina kasutati AlbPolI-FG ning Ubi-P1234^{GAA} ekspressiooniplasmiide. Katse viidi läbi, tulemused analüüsiti ja on esitatud nagu seda on kirjeldatud Joonis 17 legendis.

Kokkuvõtvalt, C6/36 rakkudes ilmnes välisgrupi viiruste replikaaside selge spetsiifilisus nende enda homoloogiliste matriitside suhtes. Eriti selgelt oli see nähtav transkriptsiooni puhul, kus nende viiruste replikaasid eelistasid tugevalt oma homoloogilist matriitsi. Suure tõenäosusega tingis selle spetsiifilisus SG promootori suhtes. Reeglist erinevalt käitus SINV replikaas, mis suutis kasutada ka EILV matriitsi.

Nagu ka ülal (Joonis 12) näidatud, oli EILV replikaasi aktiivsus C6/36 rakkudes oluliselt kõrgem kui inimese rakkudes. Huvitav on aga EILV juures see, et kuigi EILV matriitsi replitseerisid ning transkribeerisid nii SFV kompleksi kui ka välisgruppi kuuluvate viiruste replikaasid, suutis EILV replikaas teiste viiruste matriitsidest arvestataval määral kasutada vaid SINV matriits-RNAd. Ka SINV replikaas ei kasutanud peale enda matriitsi muude viiruste RNAsid, va EILV matriitsi. Seega on SINV ja EILV matriitsid universaalsed, kuid vastavad replikaasid kõrge matriitsi spetsiifilisusega. Teineteise matriitside riskasutamine võib viidata põnevatele SINV ning EILVga seotud evolutsioonilistele eripäradele. On võimalik, et kunagi ammu kaotas SINV-sarnane viirus replitseerimise võime selgrootutes. Teine variant on see, et EILV-sarnane viirus omandas võime replitseeruda selgrootes. Käesolevas töös on näidatud, et EILV *trans*-replikaas on aktiivne nii sääse kui ka imetajarakkudes (Joonised 11A ja 12A). Ilmneb, et replikatsiooni toimumiseks on EILVil vaja küll optimaalset temperatuuri (28 °C), kuid puudub absoluutne vajadus sääse-spetsiifilistele faktorite järele. See näitab, et sääse-spetsiifilistel viirustel (EILV näitel) ei ole vaja omandada võimekust replitseeruda imetajarakkudes, vaid see on neil juba olemas. See fakt toetab võimalust, et arboviirused tekkisid sääse-spetsiifilistest viirustest.

Mida veel võib matriitside riskasutamisest järeldada? Sellist riskasutamise võimet võib seondada nii alfaviiruste bioloogia kui evolutsiooniga. Mõlemal juhul on eelduseks kahe viiruse koinfektsioon. On olemas tõendeid, et sellised koinfektsioonid on üsna tavalised. Nii tuvastati Keenias läbi viidud uuringu käigus, et 38% inimestest, kes on nakatunud CHIKV või ONNVga, on tegelikult olnud nakatunud mõlemaga (LaBeaud *et al.*, 2015). See ning fakt, et CHIKV vaktsiinikandidaadid suudavad kaitset pakkuda ka ONNV vastu, annab põhjust uskuda, et CHIKV ning ONNV koinfektsioon võib olla üsna sagedane nähtus. Siin näidati, et ONNV ning CHIKV replikaasid suudavad inimese rakkudes teineteise matriitse kasutada. Seega luuakse võimalus hübriidsete genoomide tekkimiseks ja replitseerumiseks. Ehkki on küsitav, kas konkreetsetele viirustele on see bioloogiliselt kasulik või kahjulik, on selge, et evolutsioonilises plaanis loob selline rekombinatsioon võimaluse uute viiruste tekkimiseks. See, et SFV kompleksi kuuluvate viiruste replikaasid suutsid efektiivselt replitseerida ning transkribeerida nii SFV kompleksi kui ka välisgruppi kuuluvate viiruste matriitse, on märk sellest, et rekombinatsioon võiks toimuda nii lähedalt kui ka kaugelt suguluses olevate alfaviiruste vahel. Selles plaanis näib olema oluline ka asjaolu, et nii inimese kui ka sääse rakkudes suutsid alfaviirused replitseerida ning transkribeerida sääse-spetsiifilist EILV matriitsi. See näitab, et rekombinatsioon, mille tulemuseks oleks elujõuline järglane, võiks toimuda ka sääse-spetsiifiliste ning selgrootesid nakatavate alfaviiruste vahel. Sääskede spetsiifilisi alfaviiruseid on seni veel vähe uuritud, kuid analoogia põhjal teiste viiruste rühmadega (näiteks

flaviviirustega) võib oletada, et selliseid viiruseid leidub arvukalt ja et nad on geneetiliselt mitmekesised. See omakorda tähendab, et looduses eksisteerib suur reservuaar alfaviiruste järjestusi, mis koinfektsioonil võivad üle kanduda arboviiruste genoomidesse ja panna aluse uudsete omadustega viiruste tekkele.

2.3.5. ALFAVIIRUSTE MATRIITSIDE VIIRUS-SPETSIIFILISUS TULENEB GENOOMI 5' NING SG REGIOONIDEST

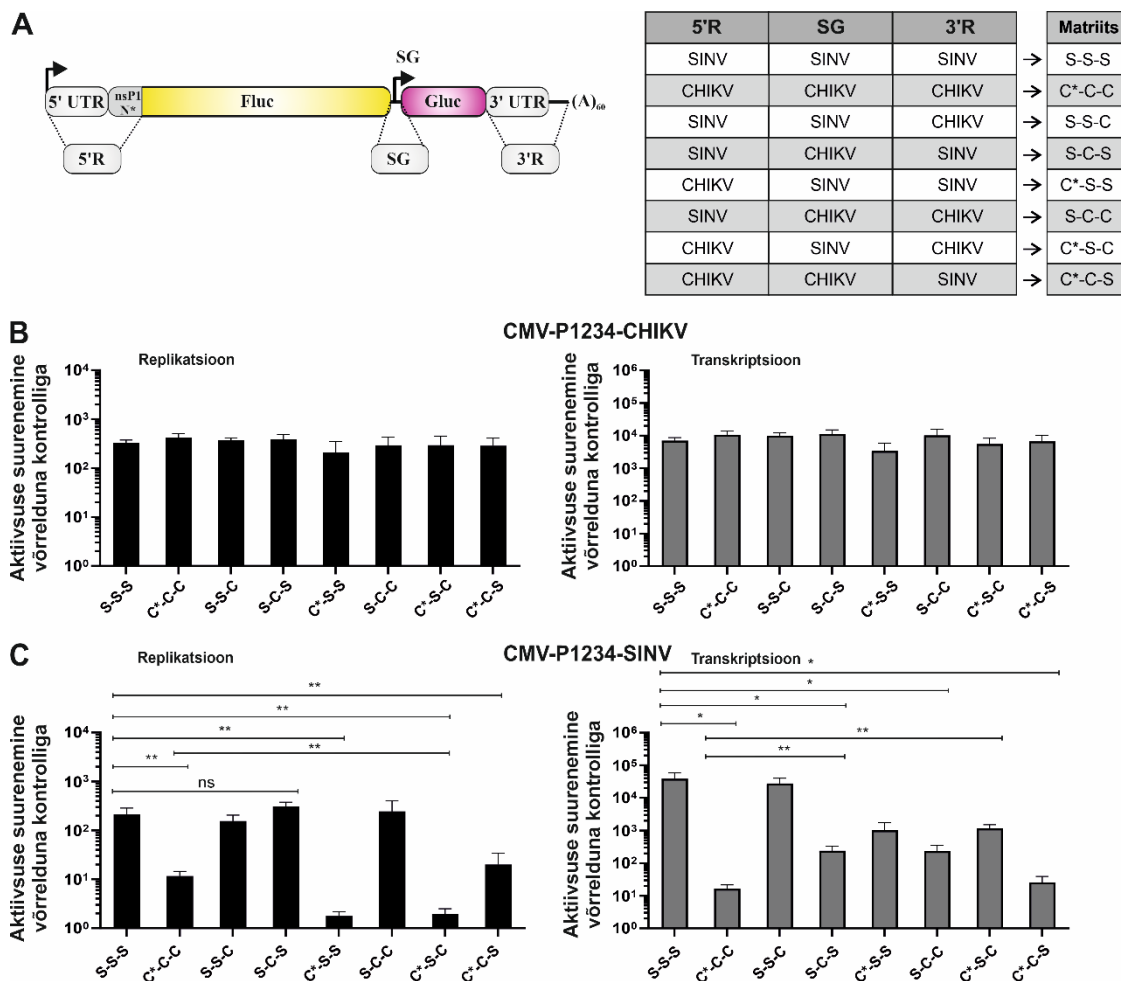
CHIKV replikaas suudab SINV matriitsi nii replitseerida kui ka transkribeerida (Joonis 15A), samal ajal, kui SINV replikaas kasutab CHIKV matriitsi nii replikatsioonil kui ka transkriptsioonil väga ebaefektiivselt (Joonised 14A ja 16B). Lisaks on varasemalt näidatud, et kui SINV matriitsi 5' UTR vahetada SFV oma vastu, siis väheneb oluliselt matriitsi kasutamine SINV replikaasi poolt (Frolov *et al.*, 2001). Selline mitteretsiprookne käitumine andis hea võimaluse uurida, mis regioon SINV matriits-RNAs sellise spetsiifilisuse eest vastutab.

Suurendamaks katse tundlikkust viidi matriitsi spetsiifilisuse kaardistamise katsed läbi SINV ja CHIKV *trans*-replikaaside aktiivsuste jaoks optimaalsetes tingimustes, kasutades U2OS rakke ning 12-auguse plaadi formaati. Samuti ühtlustati selleks katseks CHIKV ning SINV matriitsid, millel ülal kirjeldatud katsetes olid erinevate pikkustega 5' regioonid. Nagu eelpool kirjeldatud, tulenes see vahe CHIKV ja SINV RNAd erinevatest sekundaarstruktuuridest (Lisa 1, Supporting Figure 1), mistõttu oli SINV matriitsi 5' otsa lisatud 105 nt pikkune täiendav lõik nsP1 ORF algusest. Vältimaks katselisi erinevusi, mis võiksid sõltuda antud 5'R pikkuste vahedest ja/või selles regioonis paiknevatest RNA struktuuridest, kasutati SINV ja CHIKV matriitsi spetsiifilisuse determinantide kaardistamiseks pikema 5'R osaga CHIKV matriits-RNAd, mida tähistati kui HSPoII-FG-C*CC. HSPoII-FG-C*CC ning HSPoII-FG-SINV (edaspidi kasutatud paralleelset nimetust HSPoII-FG-SSS) matriitsid jagunesid 5'R, SG ning 3'R viirus-päritolu osadeks. Neid osi kasutati konstrueerimaks kuute CHIKV/SINV hübriidset matriits-RNAd (Joonis 19A).

Oodatult replitseeris ning transkribeeris CHIKV replikaas efektiivselt kõiki hübriidseid matriitse, kinnitades sellega, et CHIKV replikaas suudab efektiivselt kasutada mitte ainult SINV wt matriitsi, vaid ka selle osi, mis on viidud heteroloogilisse konteksti (Joonis 19B). SINV replikaasi puhul ilmnas aga selge matriitside kasutamise spetsiifika. Kuna SINV replikaas CHIKV wt matriitsi efektiivselt kasutada ei suuda, siis oli oodatav, et ka hübriidsete matriitside kasutamisel ilmneb mingi eelistus kindla(te) regiooni(de) suhtes. Nii leiti, et kui SINV replikaas kasutas efektiivselt HSPoII-FG-SSS (wt) matriitsi, siis HSPoII-FG-C*SS puhul langes replikatsiooni efektiivsus tuvastamise piiri lähedale (Joonis 19C). Kõige madalamad replikatsiooni aktiivsused tuvastati HSPoII-FG-C*SS ning HSPoII-FG-C*CS matriitside puhul

(Joonis 19C). See näitab, et replikatsiooni efektiivseks toimumiseks on SINV replikaasile absoluutselt vajalik SINV matriitsi 5'R region. Matriitside, milles SINV 5'Ri asendas CHIKV 5'R, transkriptsioon toimus samuti madala aktiivsusega. Lisaks transkribeeriti ebaefektiivsemalt ka matriitse, kus SINV SG region oli asendatud CHIKV SG regiooniaga, näidates, et SINV replikaas on spetsiifiline ka SG promootori järjestuse suhtes. Nagu saadud tulemustest järeldada võis, oli kahel muudatusel transkriptsiooni efektiivsusele kumulatiivne (või teineteist täiendav) efekt: transkriptsiooni aktiivsus langes veelgi, kui CHIKV järjestusega olid asendatud nii 5'R kui ka SG osad.

Samas leiti, et SINV replikaasi vahendatud replikatsioonil andsid homoloogse matriitsiga lähedase aktiivsuse HSPoII-FG-SSC, HSPoII-FG-SCS ning HSPoII-FG-SCC matriitsid. Ka transkriptsiooni puhul näitas HSPoII-FG-SSC homoloogse matriitsiga lähedast aktiivsust. Need andmed näitavad, et 3'R SINV replikaasi matriitsi spetsiifilisusele olulist efekti ei oma ja erinevused replikatsioonis tulenevad 5'R regionist, samal ajal, kui transkriptsiooni jaoks on oluline ka SG region. Seda väidet toetab see, et kõige halvemini transkribeeris SINV replikaas HSPoII-FG-C*CS matriitsi (Joonis 19C).



Joonis 19. SINV replikaasil on tugev eelistus homoloogiliste 5' ja SG regionide suhtes. (A) Skemaatiline esitus SINV ning CHIKV hübriidsete matriits-RNade ekspressiooniplasmiididest. 5'R – 5' region; SG –

subgenoomne regioon; 3'R – 3' regioon; C* - 5' regioon CHIKV matriitsist, mis sisaldab 336 nukleotiidi nsP1 lugemisraami algusest. **(B-C)** U2OS rakke transfecteeriti 12-auguse plaadi formaadis X-teljel toodud matriits-RNAsid tootvate plasmiididega ning **(B)** CMV-P1234-CHIKV ning **(C)** CMV-P1234-SINV ekspressiooniplasmiididega. Tulemused normaliseeriti CMV-P1234 plasmiididele homoloogiliste CMV-P1234^{GAA} ekspressiooniplasmiidide vastu. Muus osas viidi katse läbi, tulemused analüüsiti ja on esitatud nagu seda on kirjeldatud Joonis 14 legendis. **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 (Student'i sõltumatu t-test).

Lisaks erinevatesse kompleksidesse kuuluvatele viirustele (nagu CHIKV ja SINV), täheldati matriitside ebaefektiivsemat riskasutamist ka SFV kompleksi kuuluvate viiruste puhul. Nii replitseeris ja transkribeeris RRV replikaas suhteliselt ebaefektiivselt CHIKV matriitsi

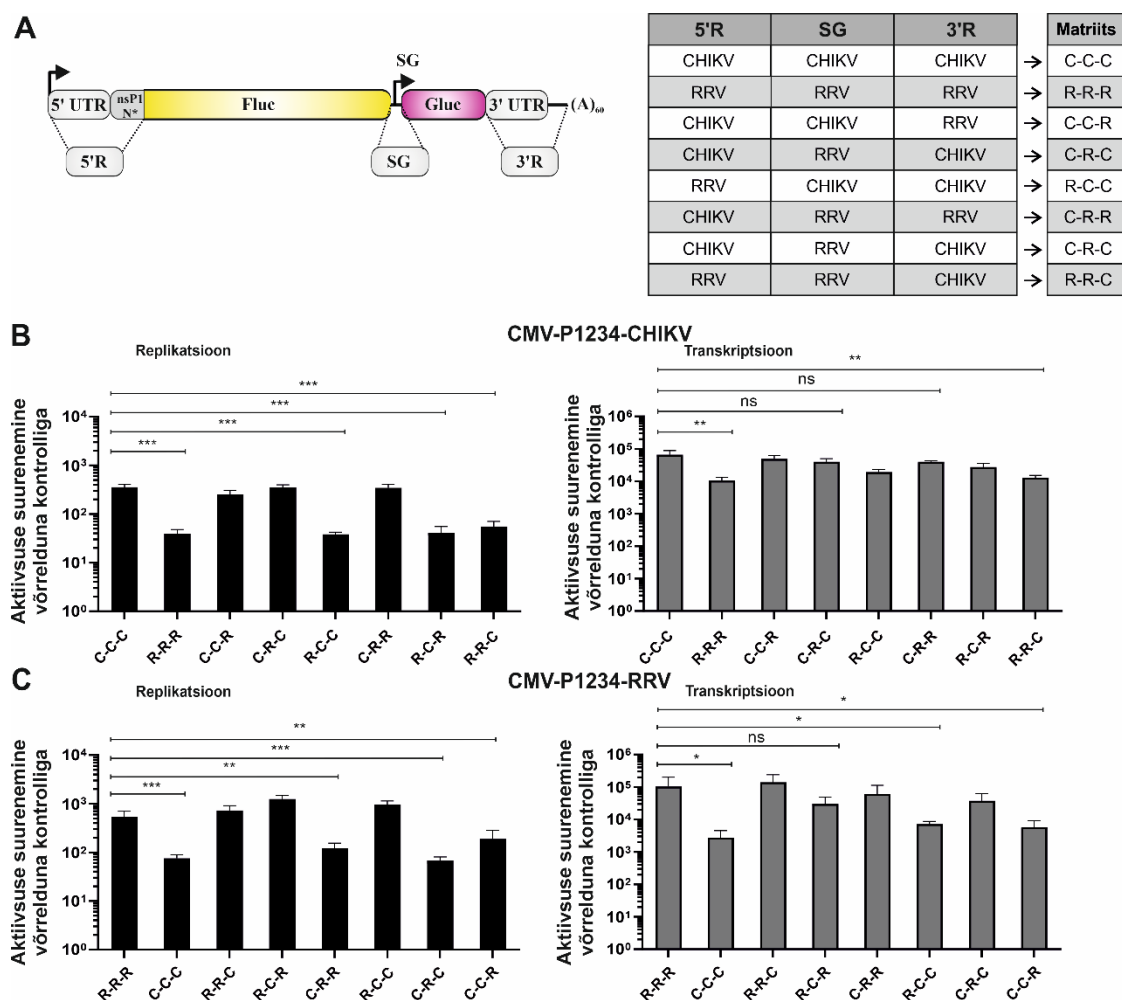
(Joonis 14A), samal ajal, kui CHIKV replikaas replitseeris RRV matriitsi madalal aktiivsusel, kuid oli kõrgelt efektiivne selle transkribeerimisel (Joonis 14C). Seega eksisteerisid matriitsi eelistused ka SFV kompleksi kuuluvatel viirustel. Tõsi, erinevalt SINV ning CHIKV replikaaside selgelt ühesuunalisest matriitside kasutamisest suutsid RRV ning CHIKV replikaasid kasutada üksteise matriitse efektiivsemalt. Replikatsioon ning ühes suunas ka transkriptsioon toimusid heteroloogiliselt matriitsilt väiksema efektiivsusega kui homoloogiliselt matriitsilt. Tegemaks kindlaks nende efektide eest vastutavaid järjestusi, konstrueeriti hübriidsed 5'R, SG ning 3'R osadest koosnevad matriitsid ka HSPoII-FG-RRV (siin nimetatud HSPoII-FG-RRR) ning HSPoII-FG-CHIKV (siin nimetatud HSPoII-FG-CCC) jaoks. Kuna RRV ja CHIKV matriitside 5'R regioonid olid ühe pikkusega, siis ei kasutatud siin HSPoII-FG-C*CC matriitsi (Joonis 20).

HSPoII-FG-CCC ning HSPoII-FG-RRR hübriidsete matriitside replikatsioonil esines sarnane üldtrend, mida nähti juba SINV ning CHIKV matriitside puhul (Joonised 20B-C). Kooskõlas ülal toodud andmetega (Joonis 14C), replitseeris CHIKV replikaas RRV matriitsi väiksema efektiivsusega kui enda homoloogilist matriitsi (Joonise 20B). Lisaks suutis CHIKV replikaas homoloogsele matriitsile lähedase efektiivsusega replitseerida kõiki mutantseid matriitseid, kus 5'R osa pärines CHIKV matriitsilt. Kui aga CHIKV 5'R vahetati RRV 5'R vastu, langes replikatsiooni aktiivsus HSPoII-FG-RRR replitseerimise aktiivsuse lähedale. See viitab jällegi asjaolule, et matriitsi replikatsioonil on vajalik homoloogiliselt matriitsilt pärinev 5'R. Sama trend ilmnis ka RRV replikaasi poolsele CHIKV/RRV mutantsete matriitside replitseerimisel (Joonis 20C). Seega kinnitasid saadud andmed, et CHIKV/RRV puhul on 5'R regioonide efekt retsiprookne.

Huvitav on siinkohal see, et RRV ning CHIKV ennustatud 5' otsa sekundaarstruktuurid on peaaegu identsed (Kendall *et al.*, 2019; Lisa 1, Supporting Figure 1). Sellest võib järeldada, et nende viiruste vastastikust matriits-RNA eelistust määravad determinandid on RNA

järjestused, mitte sekundaarstruktuurid. Huvitav on veel see, et milline osa replikaasist spetsiifilisi determinante matriits-RNA ära tunneb. Kõige tõenäolisem kandidaat selleks on nsP4 valk, mis suudab kõrge spetsiifilisusega genoomset ning SG promootorit seondada (Li ja Stollar, 2004, 2007). Töö autori poolt saadud esialgsed avaldamata andmed on selle hüpoteesiga hästi kooskõlas. CHIKV/RRV hübriidsete matriitsidega läbi viidud katsetes leidis kinnitust ka varasem tähelepanek, et RRV ja CHIKV SG promootorite kasutamine on mitte retsiprookne. CHIKV replikaas on võimeline sarnase ja kõrge aktiivsusega kasutama nii iseenda kui RRV SG promootorit (Joonis 20B). RRV replikaasil on aga mõningane eelistus oma SG promootori suhtes:

HSPoII-FG-RCR transkriptsioon RRV replikaasi poolt on homoloogilise matriitsi transkriptsioonist vähem efektiivne. Nähtud vahe ei ole küll statistiliselt usaldusväärne, samas, homoloogilise matriitsiga on selgelt ja statistiliselt usaldusväärselt erinevad HSPoII-FG-CCR ning HSPoII-FG-RCC transkriptsioonid (Joonis 20C).



Joonis 20. Alfaviiruste matriitside spetsiifilisus CHIKV/RRV hübriidsete matriitside näitel. (A) Skemaatiline esitus RRV ning CHIKV hübriidsetest matriitsi-RNA ekspressiooni-plasmiididest. 5'R – 5' regioon; SG – subgenoomne regioon; 3'R – 3' regioon; C* – 5' regioon CHIKV matriitsist, mis sisaldab 112 koodonit nsP1 lugemisraami algusest. **(B-C)** U2OS rakke transfektsiooni 12-auguse plaadi formaadis X-teljel toodud matriits-

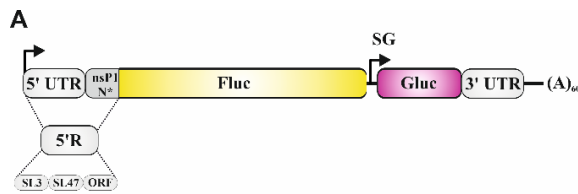
RNAdega ning (B) CMV-P1234-CHIKV, (C) CMV-P1234-RRV ekspressiooniplasmiididega. Tulemused normaliseeriti CMV-P1234 plasmiididele homoloogiliste CMV-P1234^{GAA} ekspressiooniplasmiidide vastu. Muus osas viidi katse läbi, tulemused analüüsiti ja on esitatud nagu seda on kirjeldatud Joonis 14 legendis. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (Student'i sõltumatu t-test).

2.3.6. SINV MATRIITSI EFEKTIIVSE REPLIKATSIOONI JAKS VAJALIKUD JÄRJESTUSED PAIKNEVAD 5' REGIOONI ALGUSES

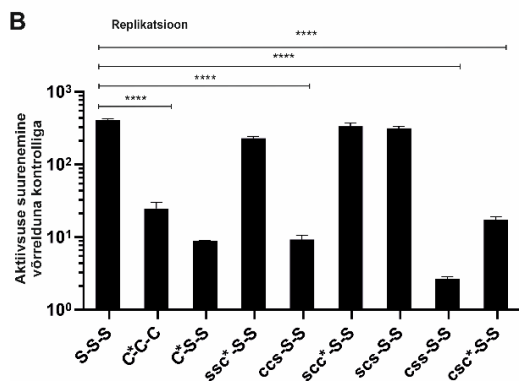
Katsed SINV/CHIKV hübriidsete matriisidega näitasid, et replikatsiooniks vajalikud determinandid paiknesid matriitsi 5'R osas. Sama täheldati ka CHIKV/RRV hübriidsete matriitsite puhul. Kuna matriitside 5'R regioon koosneb mitmest alaosast (Joonis 21A), konstrueeriti täiendavad hübriidsed matriitsid, mis sisaldasid vahetusi 5'R siseselt. Matriitside kavandamisel arvestati hiljuti avaldatud CHIKV genoomi 5' otsa struktuuriga, mis näitas, et CHIKV 5' otsas paiknevad seitse SL struktuuri (Kendall *et al.*, 2019). Need SL struktuurid võetigi aluseks SINV/CHIKV 5'R hübriidsete matriitside konstrueerimisel. Järjestusi ja nende sekundaarstruktuure analüüsis Dr. Andrew Tuplin Leeds'i Ülikoolist (Suurbritannia). Kavandatud hübriitsetes matriitsides vahetati SL3, SL47 ning nsP1 ORFi algusele vastavaid järjestusi (Joonis 21A).

Testides hübriidseid matriitse SINV replikaasiga leiti, et sarnaselt HSPoll-FG-C*CC ning HSPoll-FG-C*SS matriitsidele, replitseeris SINV replikaas ebaefektiivselt ka HSPoll-FG-ccsSS, HSPoll-FG-cssSS ning HSPoll-FG-csc*SS matriitse. Samas, HSPoll-FG-SSS (wt) sarnasel kõrgel tasemel replitseeriti HSPoll-FG-ssc*SS, HSPoll-FG-scc*SS ning HSPoll-FG-scsSS matriitse (Joonis 21B). Need tulemused näitavad selgelt, et replikatsiooni efektiivseks toimumiseks on hädavajalikud 5'R kuuluvad SL3 ja/või sellele eelnev paardumata järjestus (Lisa 1, Supplementary Figure 1, Supplementary Figure 8). Järjestuse täppisanalüüs, mille teostas meie labori doktorant Sainan Wang, kinnitas seda oletust (Lisa 1, Figure 10C). Lisaks näitas juhendaja Age Utt, et nendel järjestusel on samasugune efekt ka SINV genoomis – mutatsioonid kriitilistes regioonides vähendasid järsult vastavate rekombinantsete RNAd infektsioonilisust. Seega olid *trans*-replikaasi süsteemist pärinevad ja infektsioonilise viiruse kasutamisel saadud tulemused teineteisega heas kooskõlas.

Huvitav on see, et determinandid, mis paiknevad SINV 5'Rs ning on vajalikud SINV replikaasile matriitsi replitseerimisel, ei ole vajalikud CHIKV replikaasile. See võib viidata asjaolule, et erinevad alfaviiruste replikaasid vajavad matriitside replitseerimiseks erinevaid determinante. Nagu varasemalt mainitud, võib oletada, et SFV kompleksi replikaasidele on matriitside replitseerimiseks vajalikud faktorid pigem RNA järjestused. SINV replikaasile võivad aga vajalikud determinandid olla näiteks RNA sekundaarstruktuurid või siis nende stabiilsus. Igal juhul saab neid replikatsiooniks vajalikke RNA järjestusi ning sekundaarstruktuure täiendava iseloomustamise järel tulevikus ära kasutada näiteks antiviraalsete ühendite loomisel.



5'R			
SL3	SL47	ORF	
SINV	SINV	SINV	→ S
SINV	SINV	CHIKV	→ S-S-C*
CHIKV	CHIKV	SINV	→ C-C-S
SINV	CHIKV	CHIKV	→ S-C-C*
SINV	CHIKV	SINV	→ S-C-S
CHIKV	SINV	SINV	→ C-S-S
CHIKV	SINV	CHIKV	→ C-S-C*
CHIKV	CHIKV	CHIKV	→ C*



Joonis 21. SINV replikaas vajab matriits-RNA replitseerimiseks 5' UTR alguses paiknevaid järjestusi.

(A) Skemaatiline esitus SINV/CHIKV hübriidsetest matriits-RNA ekspressiooniplasmiididest. S-S-S matriitsi 5' regiooni viidud muutused on näidatud keskmisel paneelil. SL struktuurid CHIKV genoomi järjestuses on toodud kui SL3 ning SL47 (Kendall *et al.*, 2019). (B) U2OS rakke transfecteeriti 12-auguse plaadi formaadis CMV-P1234-SINV ning HSPoII-FG-SSS, HSPoII-FG-C*CC, HSPoII-FG-C*SS või keskmisel paneelil näidatud vahetusi sisaldavaid HSPoII-FG-SSS põhiseid matriitse ekspresseerivate plasmiididega (X-telg). Kontrollkatses transfecteeriti rakke CMV-P1234^{GAA}-SINV plasmiidiga CMV-P1234 ekspressiooniplasmiidi asemel. Muus osas viidi katse läbi, tulemused analüüsiti ja on esitatud nagu seda on kirjeldatud Joonis 14 legendis; ****p<0,0001 (Student'i sõltumatu t-test).

Kokkuvõttes laiendas läbiviidud uurimus oluliselt arusaamist alfaviiruste matriits-RNAd ja viiruse replikaaside vahelistest seostest. Viiruse RNAd sünteesiks oluliste determinantide mõistmine avab viiruste RNA replikatsiooni uurimisel palju uusi uksi. Universaalseid matriitse, nagu näiteks SINV ning EILV põhised matriits-RNAd, saab kasutada uurimaks interaktsioone alfaviiruste replikaasi valkude ja RNAd vahel. Põhjalikum RNA ning replikaasi valkude vaheliste interaktsioonide tundmine võimaldaks mõista alfaviiruste replikatsioonikomplekside moodustamist ja funktsioneerimist ning perspektiivis ka replikatsioonikomplekside rekonstrueerimist. Oleks huvitav uurida, mis osa replikaasist täpselt matriits-RNAdel replikatsiooniks vajalikke determinante ära tunneb. Selleks oleme jaganud uuritavate alfaviiruste replikaasid funktsionaalseteks komponentideks ja alustanud nn “*mix and match*” katsepaneele erinevatest viirustest pärinevate matriitside ning replikaaside komponentidega. Lisaks on kavas universaalseid matriitse kasutades luua transgeenseid rakuliine, mida kasutada alfaviiruste biosensoritena ja perspektiivis ka sellistel RNAdel põhinevaid sensoreid kandvaid katseloomi ja ülekande vektoreid.

KOKKUVÕTE

Alfaviirused on positiivse polaarsusega RNA genoomiga *Togaviridae* sugukonda kuuluv viiruste perekond. Alfaviirused nakatavad paljusid selgroogseid peremehi ja levivad põhiliselt putukvektorite vahendusel. Käesolevas töös kasutati uutset RNA polümeraasi I põhist *trans*-replikatsiooni süsteemi uurimaks alfaviiruste replikatsiooni viie SFV kompleksi ning nelja välisgruppi kuuluva viiruse põhjal. Töö eesmärkide hulka kuulusid *trans*-replikatsiooni süsteemil põhineva testsüsteemi arendamine uurimaks alfaviiruste replikaaside võimet ristkasutada heteroloogilistest viirustest pärinevaid matriitse ning alfaviiruste RNA replikatsiooniks vajalike determinantide määramine matriits-RNAdel.

Töö käigus analüüsiti alfaviiruse *trans*-replikaaside aktiivsust inimese ning sääse rakkudes. Lisaks markervalkude abil teostatud mõõtmistele kinnitati saadud tulemusi ka northern blot meetodil. Ilmnes, et kõik *trans*-replikaasid on inimese rakkudes aktiivsed. Sääse-spetsiifilisest viirusest pärinev EILV replikaas osutus temperatuuritundlikuks ja oli aktiivne vaid 28 °C juures. *Aedes albopictus* sääse rakkudes olid *trans*-replikaaside aktiivsused madalamad kui imetajarakkudes. See tulenes enamasti väiksemast hulgast rakkudest, kus replikatsioon käivitub. Erandiks osutus ONNV, mille replikaas ei olnud nendes rakkudes aktiivne. Nii sääse kui ka inimese rakkudes ilmnes, et SFV kompleksi kuuluvate viiruste matriitse suutsid replitseerida ning transkribeerida vaid SFV kompleksi kuuluvate viiruste replikaasid. Välisgrupi viiruste matriitsid osutusid rohkem universaalseteks, samas, kui vastavate viiruste replikaasid olid spetsiifilised oma matriits-RNAdele.

Käesolevast tööst näidati, et kuigi CHIKV replikaas replitseeris ning transkribeeris efektiivselt SINV matriits-RNAd, siis SINV replikaas CHIKV matriitsi efektiivselt kasutada ei suutnud. Kasutades hübriidsed matriitse, kus vahetati SINV ning CHIKV vahel genoomidest pärinevaid 5', SG ning 3' regioone või 5' regiooni osi, näidati, et SINV replikaas vajab matriits-RNA efektiivseks replitseerimiseks homoloogilise matriitsi 5' regiooni. Täpsemalt, läbi viidud katsed näitasid selgelt, et replikatsiooniks vajalikud determinandid paiknevad SINV genoomi 5' regioonis asuvas SL3 juuksenõelstruktuuris.

Antud uurimistöö tulemused andsid olulist informatsiooni alfaviiruste genoomide ja nende poolt kodeeritud replikaasivalkude funktsionaalsete seoste kohta. Replikaasidele vajalike matriits-RNAd elementide tundmine avab uusi võimalusi alfaviiruste RNA ning replikaasivalkude interaktsioonide uurimisel ning miks mitte ka alfaviiruste atenueeritud vaktsiinikandidaatide, viiruse replikatsiooni sensorite ning antiviraalsete ühendite loomisel.

SUMMARY

Cross-utilisation of template RNAs by alphavirus replicases for determining the factors required for efficient RNA replication

Alphaviruses are positive-stranded RNA viruses, belonging to the *Togaviridae* family. Alphaviruses infect many vertebrate hosts and spread mostly using mosquito vectors. In this thesis, a novel RNA polymerase I based *trans*-replication system was used to study the replication of five viruses belonging to the SFV complex and four outgroup viruses. The goals of this study included developing a test-system to study cross-utilisation of template RNAs by alphavirus replicases and constructing hybrid templates to determine the specific regions that are required for the effective replication of alphavirus templates.

In this thesis, the activity of alphavirus *trans*-replicases was studied in human and mosquito cells. The results were confirmed using northern blotting of viral RNAs. It was discovered, that in mammalian cells all *trans*-replicases were active. The mosquito-specific EILV replicase showed high sensitivity to temperature and was active only at 28 °C. All activities of the *trans*-replicases were lower in *Aedes albopictus* cells compared to human cells. The lower activities in insect cells were caused by smaller replication initiation rate rather than an ineffective replication rate. The only replicase not active in these cells belonged to ONNV. In both mammalian and insect cells, it was discovered that templates belonging to the SFV complex can only be replicated and transcribed by the replicases of the same complex. The templates of outgroup viruses showed a more universal behavior, while the replicases showed high specificity towards their own template RNAs.

In this study, it was shown that the CHIKV replicase could replicate and transcribe the template RNA of SINV effectively, but the SINV replicase could not replicate or transcribe the CHIKV template. Using SINV/CHIKV hybrid templates where 5', SG, 3' regions or parts of 5'R were swapped, it was discovered that SINV replicase needs its homologous 5'R to effectively replicate the template. More specifically, experiments showed that determinants required for effective replication lie in the SL3 of 5'R of the SINV template.

These results give important insight into the functional relations between alphaviral genomes and their encoded replicase proteins. Determining the required elements for alphavirus replication opens new ways to study the interactions between the alphavirus RNA and the replicase proteins and why not even in constructing the attenuated vaccine candidates, virus replication sensors and antiviral compounds of alphaviruses.

KASUTATUD KIRJANDUS

1. Abell, B. A., ja Brown, D. T. (1993). Sindbis virus membrane fusion is mediated by reduction of glycoprotein disulfide bridges at the cell surface. *Journal of Virology*, 67(9), 5496–5501.
2. Aguilar, P. V., Estrada-Franco, J. G., Navarro-Lopez, R., Ferro, C., Haddow, A. D., ja Weaver, S. C. (2011). Endemic Venezuelan equine encephalitis in the Americas: Hidden under the dengue umbrella. *Future virology*, 6(6), 721–740.
3. Ahola, T., ja Kääriäinen, L. (1995). Reaction in alphavirus mRNA capping: Formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(2), 507–511.
4. Ali, R., Mohammed, A., Jayaraman, J., Nandram, N., Feng, R. S., Lezcano, R. D., Seeramsingh, R., Daniel, B., Lovin, D. D., Severson, D. W., ja Ramsubhag, A. (2019). Changing patterns in the distribution of the Mayaro virus vector *Haemagogus* species in Trinidad, West Indies. *Acta Tropica*, 199, 105108.
5. Bartholomeeusen, K., Utt, A., Coppens, S., Rausalu, K., Vereecken, K., Ariën, K. K., ja Merits, A. (2018). A Chikungunya Virus trans-Replicase System Reveals the Importance of Delayed Nonstructural Polyprotein Processing for Efficient Replication Complex Formation in Mosquito Cells. *Journal of Virology*, 92(14).
6. Byrnes, A. P., ja Griffin, D. E. (1998). Binding of Sindbis Virus to Cell Surface Heparan Sulfate. *Journal of Virology*, 72(9), 7349–7356.
7. Caly, L., Horwood, P. F., Vijaykrishna, D., Lynch, S., Greenhill, A. R., Pomat, W., Rai, G., Kisa, D., Bande, G., Druce, J., ja Abdad, M. Y. (2019). Divergent Barmah Forest Virus from Papua New Guinea. *Emerging Infectious Diseases*, 25(12), 2266–2269.
8. Choi, H. K., Tong, L., Minor, W., Dumas, P., Boege, U., Rossmann, M. G., ja Wengler, G. (1991). Structure of Sindbis virus core protein reveals a chymotrypsin-like serine proteinase and the organization of the virion. *Nature*, 354(6348), 37–43.
9. Cristea, I. M., Rozjabek, H., Molloy, K. R., Karki, S., White, L. L., Rice, C. M., Rout, M. P., Chait, B. T., ja MacDonald, M. R. (2010). Host Factors Associated with the Sindbis Virus RNA-Dependent RNA Polymerase: Role for G3BP1 and G3BP2 in Virus Replication. *Journal of Virology*, 84(13), 6720–6732.
10. de Groot, R. J., Rümenapf, T., Kuhn, R. J., Strauss, E. G., ja Strauss, J. H. (1991). Sindbis virus RNA polymerase is degraded by the N-end rule pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(20), 8967–8971.

11. Esposito, D. L. A., ja Fonseca, B. A. L. da. (2017). Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? *The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 21(5), 540–544. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.06.002>
12. Fayzulin, R., ja Frolov, I. (2004). Changes of the Secondary Structure of the 5' End of the Sindbis Virus Genome Inhibit Virus Growth in Mosquito Cells and Lead to Accumulation of Adaptive Mutations. *Journal of Virology*, 78(10), 4953–4964.
13. Feibelman, K. M., Fuller, B. P., Li, L., LaBarbera, D. V., ja Geiss, B. J. (2018). Identification of small molecule inhibitors of the Chikungunya virus nsP1 RNA capping enzyme. *Antiviral Research*, 154, 124–131.
14. Firth, A. E., Chung, B. Y., Fleeton, M. N., ja Atkins, J. F. (2008). Discovery of frameshifting in Alphavirus 6K resolves a 20-year enigma. *Virology Journal*, 5, 108.
15. Frolov, I., Hardy, R., ja Rice, C. M. (2001). Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA*, 7(11), 1638–1651.
16. Garoff, H., ja Simons, K. (1974). Location of the Spike Glycoproteins in the Semliki Forest Virus Membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(10), 3988–3992.
17. Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., ja Lai, M. M. (1991). Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS Letters*, 288(1–2), 201–205.
18. Götte, B., Utt, A., Fragkoudis, R., Merits, A., ja McInerney, G. M. (2020). Sensitivity of Alphaviruses to G3BP Deletion Correlates with Efficiency of Replicase Polyprotein Processing. *Journal of Virology*, 94(7).
19. Hahn, C. S., Strauss, E. G., ja Strauss, J. H. (1985). Sequence analysis of three Sindbis virus mutants temperature-sensitive in the capsid protein autoprotease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(14), 4648–4652.
20. Hardy, W. R., ja Strauss, J. H. (1989). Processing the nonstructural polyproteins of sindbis virus: Nonstructural proteinase is in the C-terminal half of nsP2 and functions both in cis and in trans. *Journal of Virology*, 63(11), 4653–4664.
21. Harley, D., Sleight, A., ja Ritchie, S. (2001). Ross River Virus Transmission, Infection, and Disease: A Cross-Disciplinary Review. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 909–932.
22. Herrero, L. J., Lidbury, B. A., Bettadapura, J., Jian, P., Herring, B. L., Hey-Cunningham, W. J., Sheng, K.-C., Zakhary, A., ja Mahalingam, S. (2014). Characterization of Barmah

- Forest virus pathogenesis in a mouse model. *Journal of General Virology*, 95(10), 2146–2154.
23. Hyde, J. L., Chen, R., Trobaugh, D. W., Diamond, M. S., Weaver, S. C., Klimstra, W. B., ja Wilusz, J. (2015). The 5' and 3' ends of alphavirus RNAs – non-coding is not non-functional. *Virus research*, 206, 99–107.
 24. Jose, J., Snyder, J. E., ja Kuhn, R. J. (2009). A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiology*, 4(7), 837–856.
 25. Kallio, K., Hellström, K., Jokitalo, E., ja Ahola, T. (2016). RNA Replication and Membrane Modification Require the Same Functions of Alphavirus Nonstructural Proteins. *Journal of Virology*, 90(3), 1687–1692.
 26. Kamer, G., ja Argos, P. (1984). Primary structural comparison of RNAdependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Research*, 12(18), 7269–7282.
 27. Kendall, C., Khalid, H., Müller, M., Banda, D. H., Kohl, A., Merits, A., Stonehouse, N. J., ja Tuplin, A. (2019). Structural and phenotypic analysis of Chikungunya virus RNA replication elements. *Nucleic Acids Research*, 47(17), 9296–9312. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz640>
 28. Khan, A. H., Morita, K., Parquet, M. del C., Hasebe, F., Mathenge, E. G. M., ja Igarashi, A. (2002). Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation siteThe GenBank accession number of the sequence reported in this paper is AF369024. *Journal of General Virology*, 83(12), 3075–3084.
 29. Kizu, J., Neuman, C., Le Grand, L., ja Liu, W. (2019). Discovery of Cocirculating Ross River Virus and Barmah Forest Virus At Wide Bay Military Training Area, Northeastern Australia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 35(3), 220–223.
 30. Kiwanuka, N., Sanders, E. J., Rwaguma, E. B., Kawamata, J., Ssengooba, F. P., Najjemba, R., Were, W. A., Lamunu, M., Bagambisa, G., Burkot, T. R., Dunster, L., Lutwama, J. J., Martin, D. A., Cropp, C. B., Karabatsos, N., Lanciotti, R. S., Tsai, T. F., ja Campbell, G. L. (1999). O'Nyong-Nyong Fever in South-Central Uganda, 1996—1997: Clinical Features and Validation of a Clinical Case Definition for Surveillance Purposes. *Clinical Infectious Diseases*, 29(5), 1243–1250.
 31. Knope, K. E., Kurucz, N., Doggett, S. L., Muller, M., Johansen, C. A., Feldman, R., Hobby, M., Bennett, S., Sly, A., Lynch, S., Currie, B. J., Nicholson, J., ja National Arbovirus and Malaria Advisory Committee. (2016). Arboviral diseases and malaria in Australia, 2012-13: Annual report of the National Arbovirus and Malaria Advisory Committee. *Communicable Diseases Intelligence Quarterly Report*, 40(1), E17-47.

32. Kubes, V., ja Ríos, F. A. (1939). THE CAUSATIVE AGENT OF INFECTIOUS EQUINE ENCEPHALOMYELITIS IN VENEZUELA. *Science* (New York, N.Y.), 90(2323), 20–21.
33. Kuhn, R. J., Hong, Z., ja Strauss, J. H. (1990). Mutagenesis of the 3' nontranslated region of Sindbis virus RNA. *Journal of Virology*, 64(4), 1465–1476.
34. Kujala, P., Ikäheimonen, A., Ehsani, N., Vihinen, H., Auvinen, P., ja Kääriäinen, L. (2001). Biogenesis of the Semliki Forest Virus RNA Replication Complex. *Journal of Virology*, 75(8), 3873–3884.
35. Laakkonen, P., Ahola, T., ja Kääriäinen, L. (1996). The effects of palmitoylation on membrane association of Semliki forest virus RNA capping enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(45), 28567–28571. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.45.28567>
36. Laakkonen, P., Hyvönen, M., Peränen, J., ja Kääriäinen, L. (1994). Expression of Semliki Forest virus nsP1-specific methyltransferase in insect cells and in *Escherichia coli*. *Journal of Virology*, 68(11), 7418–7425.
37. LaBeaud, A. D., Banda, T., Brichard, J., Muchiri, E. M., Mungai, P. L., Mutuku, F. M., Borland, E., Gildengorin, G., Pfeil, S., Teng, C. Y., Long, K., Heise, M., Powers, A. M., Kitron, U., ja King, C. H. (2015). High Rates of O'Nyong Nyong and Chikungunya Virus Transmission in Coastal Kenya. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2).
38. Lavergne, A., Thoisy, B. de, Lacoste, V., Pascalis, H., Pouliquen, J.-F., Mercier, V., Tolou, H., Dussart, P., Morvan, J., Talarmin, A., ja Kazanji, M. (2006). Mayaro virus: Complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. *Virus Research*, 117(2), 283–290.
39. Law, Y.-S., Utt, A., Tan, Y. B., Zheng, J., Wang, S., Chen, M. W., Griffin, P. R., Merits, A., ja Luo, D. (2019). Structural insights into RNA recognition by the Chikungunya virus nsP2 helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(19), 9558–9567.
40. LeDuc, J. W., Pinheiro, F. P., ja Travassos da Rosa, A. P. (1981). An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. II. Epidemiology. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30(3), 682–688.
41. Lemm, J. A., Rümenapf, T., Strauss, E. G., Strauss, J. H., ja Rice, C. M. (1994). Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: A model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *The EMBO Journal*, 13(12), 2925–2934.
42. Levi, L. I., ja Vignuzzi, M. (2019). Arthritogenic Alphaviruses: A Worldwide Emerging Threat? *Microorganisms*, 7(5).

43. Levis, R., Weiss, B. G., Tsiang, M., Huang, H., ja Schlesinger, S. (1986). Deletion mapping of sindbis virus DI RNAs derived from cDNAs defines the sequences essential for replication and packaging. *Cell*, 44(1), 137–145.
44. Liljeström, P., Lusa, S., Huylebroeck, D., ja Garoff, H. (1991). In vitro mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest virus: The small 6,000-molecular-weight membrane protein modulates virus release. *Journal of Virology*, 65(8), 4107–4113.
45. Liljeström, Peter, ja Garoff, H. (1991). A New Generation of Animal Cell Expression Vectors Based on the Semliki Forest Virus Replicon. *Bio/Technology*, 9(12), 1356–1361.
46. Loewy, A., Smyth, J., von Bonsdorff, C. H., Liljeström, P., ja Schlesinger, M. J. (1995). The 6-kilodalton membrane protein of Semliki Forest virus is involved in the budding process. *Journal of Virology*, 69(1), 469–475.
47. Lu, Y. E., ja Kielian, M. (2000). Semliki Forest Virus Budding: Assay, Mechanisms, and Cholesterol Requirement. *Journal of Virology*, 74(17), 7708–7719.
48. Lulla, V., Karo-Astover, L., Rausalu, K., Merits, A., ja Lulla, A. (2013). Presentation Overrides Specificity: Probing the Plasticity of Alphaviral Proteolytic Activity through Mutational Analysis. *Journal of Virology*, 87(18), 10207–10220.
49. Lulla, V., Sawicki, D. L., Sawicki, S. G., Lulla, A., Merits, A., ja Ahola, T. (2008). Molecular Defects Caused by Temperature-Sensitive Mutations in Semliki Forest Virus nsP1. *Journal of Virology*, 82(18), 9236–9244.
50. McPherson, R. L., Abraham, R., Sreekumar, E., Ong, S.-E., Cheng, S.-J., Baxter, V. K., Kistemaker, H. A. V., Filippov, D. V., Griffin, D. E., ja Leung, A. K. L. (2017). ADP-ribosylhydrolase activity of Chikungunya virus macrodomain is critical for virus replication and virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(7), 1666–1671.
51. Mendes, A., ja Kuhn, R. J. (2018). Alphavirus Nucleocapsid Packaging and Assembly. *Viruses*, 10(3).
52. Morley, V. J., Noval, M. G., Chen, R., Weaver, S. C., Vignuzzi, M., Stapleford, K. A., ja Turner, P. E. (2018). Chikungunya virus evolution following a large 3'UTR deletion results in host-specific molecular changes in protein-coding regions. *Virus Evolution*, 4(1).
53. Naish, S., Hu, W., Mengersen, K., ja Tong, S. (2011). Spatio-Temporal Patterns of Barmah Forest Virus Disease in Queensland, Australia. *PLoS ONE*, 6(10).
54. Nasar, F., Gorchakov, R. V., Tesh, R. B., ja Weaver, S. C. (2014). Eilat Virus Host Range Restriction Is Present at Multiple Levels of the Virus Life Cycle. *Journal of Virology*, 89(2), 1404–1418.

55. Nasar, F., Palacios, G., Gorchakov, R. V., Guzman, H., Da Rosa, A. P. T., Savji, N., Popov, V. L., Sherman, M. B., Lipkin, W. I., Tesh, R. B., ja Weaver, S. C. (2012). Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(36), 14622–14627.
56. Neuvonen, M., Kazlauskas, A., Martikainen, M., Hinkkanen, A., Ahola, T., ja Saksela, K. (2011). SH3 Domain-Mediated Recruitment of Host Cell Amphiphysins by Alphavirus nsP3 Promotes Viral RNA Replication. *PLoS Pathogens*, 7(11).
57. Niesters, H. G., ja Strauss, J. H. (1990). Mutagenesis of the conserved 51-nucleotide region of Sindbis virus. *Journal of Virology*, 64(4), 1639–1647.
58. Oberste, M. S., Parker, M. D., ja Smith, J. F. (1996). Complete Sequence of Venezuelan Equine Encephalitis Virus Subtype IE Reveals Conserved and Hypervariable Domains within the C Terminus of nsP3. *Virology*, 219(1), 314–320.
59. Ou, J. H., Rice, C. M., Dalgarno, L., Strauss, E. G., ja Strauss, J. H. (1982). Sequence studies of several alphavirus genomic RNAs in the region containing the start of the subgenomic RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(17), 5235–5239.
60. Partidos, C. D., Paykel, J., Weger, J., Borland, E. M., Powers, A. M., Seymour, R., Weaver, S. C., Stinchcomb, D. T., ja Osorio, J. E. (2012). Cross-Protective Immunity against O’Nyong-nyong Virus Afforded by a Novel Recombinant Chikungunya Vaccine. *Vaccine*, 30(31), 4638–4643.
61. Peränen, J., Laakkonen, P., Hyvönen, M., ja Kääriäinen, L. (1995). The Alphavirus Replicase Protein nsP1 Is Membrane-Associated and Has Affinity to Endocytic Organelles. *Virology*, 208(2), 610–620.
62. Pietilä, M. K., Hellström, K., ja Ahola, T. (2017). Alphavirus polymerase and RNA replication. *Virus Research*, 234, 44–57. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.007>
63. Pingen, M., Bryden, S. R., Pondeville, E., Schnettler, E., Kohl, A., Merits, A., Fazakerley, J. K., Graham, G. J., ja McKimmie, C. S. (2016). Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection. *Immunity*, 44(6), 1455–1469.
64. Powers, A. M., Brault, A. C., Tesh, R. B., ja Weaver, S. C. (2000). Re-emergence of chikungunya and o’nyong-nyong viruses: Evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *Journal of General Virology*, 81(2), 471–479.
65. Rikonen, M., Peränen, J., ja Kääriäinen, L. (1994). ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *Journal of Virology*, 68(9), 5804–5810.

66. Rose, P. P., Hanna, S. L., Spiridigliozzi, A., Wannissorn, N., Beiting, D. P., Ross, S. R., Hardy, R. W., Bambina, S. A., Heise, M. T., ja Cherry, S. (2011). Natural Resistance-associated Macrophage Protein (NRAMP) is a cellular receptor for Sindbis virus in both insect and mammalian hosts. *Cell host ja microbe*, 10(2), 97–104.
67. Rupp, J. C., Jundt, N., ja Hardy, R. W. (2011). Requirement for the Amino-Terminal Domain of Sindbis Virus nsP4 during Virus Infection. *Journal of Virology*, 85(7), 3449–3460.
68. Salonen, A., Vasiljeva, L., Merits, A., Magden, J., Jokitalo, E., ja Kääriäinen, L. (2003). Properly Folded Nonstructural Polyprotein Directs the Semliki Forest Virus Replication Complex to the Endosomal Compartment. *Journal of Virology*, 77(3), 1691–1702.
69. Sanders, E. J., Rwaguma, E. B., Kawamata, J., Kiwanuka, N., Lutwama, J. J., Ssengooba, F. P., Lamunu, M., Najjemba, R., Were, W. A., Bagambisa, G., ja Campbell, G. L. (1999). O'nyong-nyong Fever in South-Central Uganda, 1996–1997: Description of the Epidemic and Results of a Household-Based Seroprevalence Survey. *The Journal of Infectious Diseases*, 180(5), 1436–1443.
70. Sanmartin-Barberi, C., Groot, H., ja Osorno-Mesa, E. (1954). Human epidemic in Colombia caused by the Venezuelan equine encephalomyelitis virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 3(2), 283–293.
71. Shin, G., Yost, S. A., Miller, M. T., Elrod, E. J., Grakoui, A., ja Marcotrigiano, J. (2012). Structural and functional insights into alphavirus polyprotein processing and pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(41), 16534–16539.
72. Shirako, Y., ja Strauss, J. H. (1994). Regulation of Sindbis virus RNA replication: Uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *Journal of Virology*, 68(3), 1874–1885.
73. Shirako, Y., ja Strauss, J. H. (1998). Requirement for an aromatic amino acid or histidine at the N terminus of Sindbis virus RNA polymerase. *Journal of Virology*, 72(3), 2310–2315.
74. Shirako, Yukio, Strauss, E. G., ja Strauss, J. H. (2000). Suppressor Mutations That Allow Sindbis Virus RNA Polymerase to Function with Nonaromatic Amino Acids at the N-Terminus: Evidence for Interaction between nsP1 and nsP4 in Minus-Strand RNA Synthesis. *Virology*, 276(1), 148–160.
75. Singh, I., ja Helenius, A. (1992). Role of ribosomes in Semliki Forest virus nucleocapsid uncoating. *Journal of Virology*, 66(12), 7049–7058.

76. Spuul, P., Balistreri, G., Hellström, K., Golubtsov, A. V., Jokitalo, E., ja Ahola, T. (2011). Assembly of Alphavirus Replication Complexes from RNA and Protein Components in a Novel trans-Replication System in Mammalian Cells ▽. *Journal of Virology*, 85(10), 4739–4751.
77. Spuul, P., Balistreri, G., Kääriäinen, L., ja Ahola, T. (2010). Phosphatidylinositol 3-Kinase-, Actin-, and Microtubule-Dependent Transport of Semliki Forest Virus Replication Complexes from the Plasma Membrane to Modified Lysosomes. *Journal of Virology*, 84(15), 7543–7557.
78. Spuul, P., Salonen, A., Merits, A., Jokitalo, E., Kääriäinen, L., ja Ahola, T. (2007). Role of the Amphipathic Peptide of Semliki Forest Virus Replicase Protein nsP1 in Membrane Association and Virus Replication. *Journal of Virology*, 81(2), 872–883.
79. Strauss, E. G., Levinson, R., Rice, C. M., Dalrymple, J., ja Strauss, J. H. (1988). Nonstructural proteins nsP3 and nsP4 of Ross River and O’Nyong-nyong viruses: Sequence and comparison with those of other alphaviruses. *Virology*, 164(1), 265–274.
80. Strauss, E. G., Rice, C. M., ja Strauss, J. H. (1983). Sequence coding for the alphavirus nonstructural proteins is interrupted by an opal termination codon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(17), 5271–5275.
81. Strauss, J. H., ja Strauss, E. G. (1994). The alphaviruses: Gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews*, 58(3), 491–562.
82. Suhrbier, A., Jaffar-Bandjee, M.-C., ja Gasque, P. (2012). Arthritogenic alphaviruses—An overview. *Nature Reviews Rheumatology*, 8(7), 420–429.
83. Sun, C., Gardner, C. L., Watson, A. M., Ryman, K. D., ja Klimstra, W. B. (2014). Stable, High-Level Expression of Reporter Proteins from Improved Alphavirus Expression Vectors To Track Replication and Dissemination during Encephalitic and Arthritogenic Disease. *Journal of Virology*, 88(4), 2035–2046.
84. Zhao, H., ja Garoff, H. (1992). Role of cell surface spikes in alphavirus budding. *Journal of Virology*, 66(12), 7089–7095.
85. Žusinaite, E., Tints, K., Kiiver, K., Spuul, P., Karo-Astover, L., Merits, A., ja Sarand, I. (2007). Mutations at the palmitoylation site of non-structural protein nsP1 of Semliki Forest virus attenuate virus replication and cause accumulation of compensatory mutations. *The Journal of General Virology*, 88(Pt 7), 1977–1985.
86. Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E., ja Higgs, S. (2007). A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLOS Pathogens*, 3(12), e201.

87. Utt, A., Quirin, T., Saul, S., Hellström, K., Ahola, T., ja Merits, A. (2016). Versatile Trans-Replication Systems for Chikungunya Virus Allow Functional Analysis and Tagging of Every Replicase Protein. *PLoS ONE*, 11(3).
88. Utt, A., Rausalu, K., Jakobson, M., Männik, A., Alphey, L., Fragkoudis, R., ja Merits, A. (2019). Design and Use of Chikungunya Virus Replication Templates Utilizing Mammalian and Mosquito RNA Polymerase I-Mediated Transcription. *Journal of Virology*, 93(18).
89. Vihinen, H., ja Saarinen, J. (2000). Phosphorylation site analysis of Semliki forest virus nonstructural protein 3. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 27775–27783.
90. Vogels, C. B. F., Rückert, C., Cavany, S. M., Perkins, T. A., Ebel, G. D., ja Grubaugh, N. D. (2019). Arbovirus coinfection and co-transmission: A neglected public health concern? *PLoS Biology*, 17(1).
91. Wahlberg, J. M., Bron, R., Wilschut, J., ja Garoff, H. (1992). Membrane fusion of Semliki Forest virus involves homotrimers of the fusion protein. *Journal of Virology*, 66(12), 7309–7318.
92. Wang, K. S., Kuhn, R. J., Strauss, E. G., Ou, S., ja Strauss, J. H. (1992). High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. *Journal of Virology*, 66(8), 4992–5001.
93. Weaver, S. C., ja Forrester, N. L. (2015). Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Research*, 120, 32–39. Webb, E. M., Azar, S. R., Haller, S. L., Langsjoen, R. M., Cuthbert, C. E., Ramjag, A. T., Luo, H., Plante, K., Wang, T., Simmons, G., Carrington, C. V. F., Weaver, S. C., Rossi, S. L., ja Auguste, A. J. (2019). Effects of Chikungunya virus immunity on Mayaro virus disease and epidemic potential. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56551-3>
94. Weiss, B., Nitschko, H., Ghattas, I., Wright, R., ja Schlesinger, S. (1989). Evidence for specificity in the encapsidation of Sindbis virus RNAs. *Journal of Virology*, 63(12), 5310–5318.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. CDC (2019), <https://www.cdc.gov/chikungunya/index.html> (viimati külastatud 8.07.2020)
2. CDC (2020), <https://www.cdc.gov/chikungunya/geo/united-states.html> (viimati külastatud 14.07.20)
3. ECDC (2020), <https://www.ecdc.europa.eu/en/sindbis-fever/facts> (viimati külastatud 8.07.20)
4. ICTV (2019), https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-RNAviruses/w/togaviridae#Summary (viimati külastatud 8.07.2020)

5. Johns Hopkins University, CSSE (2020),
<https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6> (viimati külastatud 29.06.20)
6. WHO (2019), http://www.who.int/denguecontrol/arbo-viral/other_arboviral_chikungunya/en/ (viimati külastatud 8.07.2020)

LISAD

Lisa 1.

Artikkel on peale kahte ringi parandusi ning täiendusi vastu võetud ajakirja “PLOS Pathogens”

Cross-utilisation of template RNAs by alphavirus replicases

Laura Sandra Lello^{1¶}, Age Utt^{1¶}, Koen Bartholomeeusen², Sainan Wang¹, Kai Rausalu¹, Catherine Kendall⁴, Sandra Coppens², Rennos Fragkoudis^{3#}, Andrew Tuplin⁴, Luke Alphey⁵, Kevin K. Ariën^{2,6} and Andres Merits^{1*}

¹ Institute of Technology, University of Tartu, Tartu, Estonia

² Department of Biomedical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerpen, Belgium

³ University of Nottingham, School of Veterinary Medicine and Science, Loughborough, UK

⁴ Faculty of Biological Sciences and Astbury Centre for Structural and Molecular Biology, University of Leeds, Leeds, UK

⁵ The Pirbright Institute, Woking, UK

⁶ Department of Biomedical Sciences, University of Antwerp, Antwerpen, Belgium

Current address: Edinburgh Genome Foundry, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

* Corresponding author

E-mail: andres.merits@ut.ee

¶ The authors contributed equally to this work.

Abstract

Most alphaviruses (family *Togaviridae*) including Sindbis virus (SINV) and other human pathogens, are transmitted by arthropods. The first open reading frame in their positive strand RNA genome encodes for the non-structural polyprotein, a precursor to four separate subunits of the replicase. The replicase interacts with *cis*-acting elements located near the intergenic region and at the ends of the viral RNA genome. A *trans*-replication assay was developed and used to analyse the template requirements for nine alphavirus replicases. Replicases of alphaviruses of the Semliki Forest virus complex were able to cross-utilize each other's templates as well as those of outgroup alphaviruses. Templates of outgroup alphaviruses, including SINV and the mosquito-specific Eilat virus, were promiscuous; in contrast, their replicases displayed a limited capacity to use heterologous templates, especially in mosquito cells. The determinants important for efficient replication of template RNA were mapped to the 5' region of the genome. For SINV these include the extreme 5'- end of the genome and sequences corresponding to the first stem-loop structure in the 5' untranslated region. Mutations introduced in these elements drastically reduced infectivity of recombinant SINV genomes. The *trans*-replicase tools and approaches developed here can be instrumental in studying alphavirus recombination and evolution, but can also be applied to study other viruses such as picornaviruses, flaviviruses and coronaviruses.

Authors summary

Alphaviruses are positive-strand RNA viruses, most of which use mosquitoes to spread between vertebrate hosts; many are human pathogens with potentially severe medical consequences. Some alphavirus species are believed to have resulted from the recombination between different members of the genus and there is evidence of movement of alphaviruses between continents. Here, a novel assay uncoupling viral replicase and template RNA production was developed and used to analyse cross-utilization of alphavirus template RNAs. We observed that replicases of closely related alphaviruses belonging to the Semliki Forest virus complex can generally use each other's template RNAs as well as those of distantly related outgroup viruses. In contrast, replicases of outgroup viruses clearly preferred homologous template RNAs. These trends were observed in both mammalian and mosquito cells, with template preferences generally more pronounced in mosquito cells. Interestingly, the template RNA of the mosquito-specific Eilat virus was efficiently used by other alphavirus replicases while Eilat replicase could not use heterologous templates. Determinants for template selectivity were mapped to the beginning of the RNA genome and template recognition was more likely based on the recognition of RNA sequences than recognition of structural elements formed by the RNAs.

Introduction

The genus *Alphavirus* (family *Togaviridae*) comprises approximately 30 known virus species. Many of these are “arboviruses”, infecting vertebrate hosts and are transmitted through the bite of an arthropod vector, commonly mosquitoes. Many alphaviruses present a threat to human health. These include chikungunya virus (CHIKV), which recently (re-)emerged in Asia, Africa and America (1), o’nyong-nyong virus (ONNV) that is widespread in Africa (2), Ross River virus (RRV) which is epidemic in Australia/Oceania (3) and Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) which is found in the Americas (4,5). In addition to arboviruses there are also horizontally transmitted alphaviruses such as salmon pancreas disease virus (salmonid alphavirus, SAV) infecting aquatic species. Some alphaviruses, such as Eilat virus (EILV), lack a vertebrate host and infect arthropods exclusively (6,7).

The members of the genus *Alphavirus* are divided into several groups (complexes) that form three major clades (6). Alphaviruses having vertebrate hosts are also often divided according to their geographical distribution and pathogenesis associated with their infection. New World alphaviruses, exemplified by VEEV and Western equine encephalitis virus (WEEV), cause encephalitis while Old World alphaviruses, including Sindbis virus (SINV, type member of the genus), CHIKV, ONNV, RRV and Barmah Forest virus (BFV) cause fever, rash and arthritic symptoms. This division is supported by molecular biological evidence indicating that Old and New World alphaviruses have different mechanisms to suppress host cell transcription and to counteract host antiviral mechanisms (8). There are also notable differences in the host factors these viruses require for their genome replication (9). However, the correlation between current geographical distributions and categorization as New or Old World alphaviruses is not absolute. For example, Mayaro virus (MAYV) found in South America belongs to the Semliki Forest virus (SFV) complex of Old World alphaviruses (6). Similarly, phylogenetic analysis suggests that SINV has its origin in the New World regions (10). Thus, it is likely that alphaviruses have spread from one geographical area to another, possibly in migratory birds (10,11). WEEV has its ancestry in a recombination event between Eastern equine encephalitis virus and SINV-like viruses (12). Taken together, the evolutionary history of alphaviruses is complex and only partially understood.

Alphaviruses have a positive strand RNA genome of approximately 12 kb in length, with a 5' type-0 N 7-methylguanosine cap structure, a 3' poly(A) tail and contain two open reading frames (ORF). The first ORF encodes four non-structural proteins (nsP1-4) as polyprotein precursors P1234 or P123, with P1234 being synthesized by read-through of a stop codon between nsP3 and nsP4 (13). These polyproteins are processed by the protease activity of the nsP2 region into intermediates and finally individual nsPs. The proteolytic processing, leading to the formation of a functional replicase complex, is tightly regulated. First, P1234 is processed into P123 and nsP4. This results in formation of the early replicase (P123+nsP4) catalysing the synthesis of negative strand RNA (14). These events coincide with the formation of membrane bound replicase complexes termed spherules (15,16). P123 is subsequently cleaved into nsP1 and P23. This is a delayed and precisely timed event; an acceleration of P123 processing attenuates viral replication or completely blocks infectivity (17). The cleavage of P123 is rapidly followed by *trans*-cleavage of P23 into mature nsP2 and nsP3 which, together with nsP1 and nsP4 form the late replicase which is responsible for the synthesis of new genomic RNA as well as sub-genomic (SG) RNA, corresponding to the 3' one third of the virus genome and used as the mRNA for expression of structural proteins (14,18). The late replicase is very active and the copy numbers of new positive strand RNAs can reach hundreds of thousands per cell. In addition to viral nsPs and cellular membranes, replicase formation and functioning requires the recruitment of various host proteins. It has been shown that some of these proteins are absolutely necessary for only one/a few alphaviruses (19) while others are essential for larger groups of alphaviruses (9).

The alphavirus genomes contain three untranslated regions (UTRs), all of which play crucial roles in virus infection (20). The 5' UTR is less than 100nt in length while the 3' UTR is up to

900nt in length. The length of the 3' UTR varies significantly between viruses and even between different isolates of the same virus. Most of this variation is due to different copy numbers of repeated sequence motifs. For CHIKV the presence of repeated motifs is essential for efficient replication in mosquito cells but has little, if any, impact on replication in vertebrate cells (21–23). The 3' UTR interacts with host protein HuR increasing the stability of viral RNAs and promoting infection both in vertebrate and mosquito cells (24). A third, intragenic, non-coding region, typically of around 50nt, is located between the two ORFs. There are four conserved sequence elements (cse) in the alphavirus genome. The first cse is located at the very 5' end of the genome and the second, so called 51-nt cse, is located in the nsP1 encoding region. The third 21-nt cse mostly overlaps with the region encoding the C-terminus of nsP4, in the downstream region of the first ORF. The final 19-nt cse, is located immediately upstream of the poly(A) tail (25). The basic significance of these elements is reasonably well-understood. The two 5' elements and 3' cse function in a coordinated manner in the synthesis of the negative and positive strands of the virus genomes (26). The element located within the nsP4 encoding region functions as a SG promoter (27). It has been demonstrated that SINV replicase can utilize SG promoters from other alphaviruses with variable efficiencies (28). There is clear evidence that nsP4, the RNA polymerase subunit of the alphavirus replicase, interacts with sequences required for genomic and SG RNA synthesis using different amino acid motifs and depends on the presence of other nsPs (29,30).

Although predicted decades ago (26,31,32) it has only recently been experimentally confirmed that the 5' end of the alphavirus genome contains numerous functional stem-loop (SL) structures. Seven SL structures were identified in the first 300nt of the CHIKV genome. It was shown that some of these structures are important for genome replication in general while others were only important for replication of the virus genome in either mammalian or in mosquito cells (33). Structural elements located at 5' end region of the alphavirus genome are also important to overcome certain host innate immune responses. For pathogenic alphaviruses they have been shown to alter binding and functioning of IFIT1, a factor responsible for inhibition of translation from RNAs with a 5' cap lacking 2'-O methylation (34). It has also been revealed that there is a functional connection between replicase proteins and RNA sequences at the ends of the alphavirus genome. In support of this, mutations in replicase proteins can be compensated for by compensatory changes in sequences at the ends of the virus genome (35). Conversely, mutations in the 3' UTR result in adaptive changes in virus-encoded proteins (23).

The alphavirus replicase possesses a high activity *in trans* and is capable of replicating RNAs containing suitable structures at their 5' and 3' ends including defective interfering (DI) RNAs (36–39). If the DI RNA contains SG promoter sequences, SG RNAs are also synthesized. These properties have been utilized to develop a packaging systems for alphavirus replicon vectors (40,41) and, more recently, *trans*-replicase systems for different alphaviruses (42–44). It has also allowed uncoupling of the replicase protein synthesis from its mRNA replication. This property was used to analyse template requirements of SFV and SINV replicases (26). However, an overall picture of the cross-utilisation of template RNAs by replicases of different alphaviruses and their host-cell type dependence has been lacking, hampering analysis of the organization of alphavirus replicase complex and replicase protein/RNA interactions. Information on the potential for cross-utilisation of template RNAs by related viruses is important for understanding the basic properties of (alpha)virus infection such as superinfection exclusion or rescue.

This study used extremely sensitive *trans*-replicase systems, constructed previously for different alphaviruses (44). The cross-utilisation of the template RNAs by the different replicases was analysed in both human and mosquito cells. This analysis revealed the existence of templates with different promiscuity. In general, the cross-utilisation of RNA templates was found to be similar in human and mosquito cells. Replicases of alphaviruses not belonging to the SFV complex showed high preference for their own RNA templates, with their capacity for using heterologous templates being more limited in mosquito cells compared to human cells.

The sequence determinants responsible for the capacity of SINRV, RRV and CHIKV replicases to use each other's templates were shown to locate in the 5' region of the template RNA. For SINRV replicase they mapped to the extreme 5' end of the genome and the first SL structure. Mutations introduced into these elements had a severe impact on template RNA replication and on the rescue of recombinant SINRV from infectious transcripts. In addition to revealing the broader picture of RNA template cross-utilisation by alphavirus replicases, our study also provides new and highly efficient tools to generate replicating RNAs that can be used for analysis of their structure in cells. This also opens new possibilities for genetic attenuation of alphaviruses and for development and analysis of compounds targeting critical regions of alphavirus RNA genomes.

Results

We have previously shown that replicases of eight arbovirus members of the *Alphavirus* genus are capable of replicating and transcribing their cognate template RNAs in human cells (44). Here, we additionally created replicase and template RNA expression constructs for the mosquito-specific EILV. In order to allow the analysis of RNA replication in mosquito cells, template RNA and replicase expression plasmids for *Ae albopictus* cells were constructed using designs previously described for CHIKV (45). Altogether, this resulted in nine sets of template RNA/replicase expression plasmids for each virus in human (Fig 1A) and *Ae albopictus* cells (Fig 1B). In order to compare replication in two different host cell types, replicase expression constructs used in this study were based on native coding sequences rather than host-cell adapted coding sequences.

SFV, MAYV, RRV, CHIKV and ONNV belong to the SFV complex while SINRV, VEEV, BFV and EILV represent outgroup alphaviruses. The relative degrees of similarity between the replicases of SFV complex and outgroup viruses are indicated in Fig 1C. The differences between outgroup viruses and those belonging to the SFV complex had an impact on the design of the template RNAs. The 5' region of the CHIKV genome contains seven SL structures that affect genome replication in mammalian and/or mosquito cells (33). As similar structures can be predicted for RNAs of other members of the SFV complex (S1 Fig), the 5' ends of the template RNAs of SFV, MAYV, RRV and ONNV had an identical design to that of the previously constructed CHIKV template, i.e. the 5' UTR was followed by 231nt encoding the N-terminus of nsP1 (43). In contrast, the predicted final downstream SL in the 5' genomic region of the outgroup viruses (equivalent to SL246 in CHIKV (33)) align less well or, for BFV and SINRV, is predicted to have different secondary structure (S1 Fig). Therefore, based on our previously published predictions for the structure and position of secondary structure elements homologous to those in CHIKV, longer coding regions of nsP1 were incorporated into the template RNAs of these viruses. These had variable lengths, i.e. 258nt for EILV, 267nt for VEEV, 339nt for BFV and 342nt for SINRV. For simplicity, hereafter the full-length RNA serving as template for Fluc expression is termed "genomic RNA" (and its synthesis as "replication"), the RNA synthesized from the SG promoter serving as template for Gluc expression is termed "SG RNA" (and its synthesis as "transcription") and all RNAs synthesized by *trans*-replicases are referred to as "viral RNAs". The levels of Fluc and Gluc expression in human cells, transfected with plasmids expressing template RNA and corresponding polymerase negative control replicase (P1234^{GAA}), were similar for *trans*-replicases derived from different viruses and the same was observed for *Ae albopictus* cells. Therefore, the efficiency of replication and transcription were estimated by fold changes ("boost") of corresponding reporter expression i.e. reporter activity in cells expressing native P1234 of alphavirus relative to those expressing its polymerase-negative P1234^{GAA} variant.

***Trans*-replicases of nine alphaviruses are active in human cells**

In human cells, the expression kinetics of the Gluc marker were highly similar for all eight *trans*-replicases of arbovirus members of the genus (Fig 2A). Based on these data, a single

time point, set at 18 h post transfection (h p.t.), was used in subsequent experiments. As expected, the mosquito-restricted EILV replicase was inactive at 37°C, however, when the experiment was performed at 28°C, significant activity was observed (Fig 2B). Thus, the EILV replicase has a temperature-sensitive phenotype in human cells, but has no absolute requirement for mosquito-specific factors. With two exceptions, the replicases of all analyzed viruses boosted the expression of Fluc and Gluc markers to high levels. The activity of ONNV replicase was clearly lower than that of other replicases, changing the time point for measurement (Fig 2A) or the ratio of replicase and template RNA expression plasmids failed to increase the boost in marker expression. It cannot be excluded that the low efficiency reflects a low level of ONNV replicase expression, for example due to rare codons and/or cryptic splicing sequences present in the coding sequence. However, it is more likely that the relatively low activity of the ONNV *trans*-replicase is a feature caused by the specific properties of ONNV P1234. VEEV *trans*-replicase, albeit efficiently boosting expression of Gluc, was relatively less efficient in boosting expression of Fluc, indicating only modest template RNA replication (Fig 2B).

In order to confirm that the quantification of Fluc and Gluc activities indeed correlate with the synthesis of viral RNAs, RNA synthesis was analyzed using northern blot. The observed levels of viral RNAs clearly correlated with those deduced from analysis of reporter activities. All highly active *trans*-replicases synthesized high levels of negative and positive strand RNAs. In contrast, synthesis of viral RNAs by EILV replicase was below the limit of detection at both 28°C and 37°C. Synthesis of negative strand RNAs by ONNV and VEEV replicases was also close to the detection level. In contrast, positive strands made by these replicases were clearly detected, although ONNV replicase was found to synthesize relatively little SG RNA (Fig 2C), which is consistent with the modest boost of Gluc expression (Fig 2B) as well as with its absolute activity (Fig 2A). The amount of SG RNA made by the VEEV replicase was much lower compared to the amounts of SG RNAs made by replicases of SINV or SFV. Compared with SINV or SFV there was approximately 10-fold difference in Gluc expression (Fig 2A), this is however less prominent than the differences observed between corresponding SG RNA levels (Fig 2C). Furthermore, the boosts of Gluc expression observed for the replicases of VEEV, SINV and SFV were similar (compare Figs 2B and 2C). Most likely the somewhat elevated expression levels of Gluc in the VEEV *trans*-replication system originated from basic properties of the VEEV replicase. nsP2 and nsP3 proteins of Old World alphaviruses inhibit transcription and translation in vertebrate cells (46,47). In New World alphaviruses the most prominent inducer of cytotoxic effects is the capsid protein (8) which is absent in the VEEV *trans*-replicase. It has been observed that in the absence of host cell shutdown the SG RNAs of alphaviruses lose their competitive advantage over the host cell mRNAs but, nonetheless, the absolute translation efficiency of the SG RNA increases (48–50). Therefore, it is reasonable to assume that SG RNAs made by the VEEV replicase are more efficiently translated than those made by *trans*-replicases of Old World alphaviruses.

Alphavirus *trans*-replicase activity in *Aedes albopictus* cells.

Except for ONNV all *trans*-replicases were found to display similar Gluc expression profiles in *Ae. albopictus* cells (Fig 3A), enabling us to use a single time point, set at 48 h p.t., for subsequent experiments performed in C6/36 cells. Analysis performed in C6/36 cells also revealed that the activities of alphavirus *trans*-replicases were approximately 10–40-fold lower than in human cells. The boost of Fluc expression was typically as low as 10-fold while the boost of Gluc expression was around 1000-fold. Not surprisingly, the exception to this rule was the EILV *trans*-replicase, for which both replication and transcription in C6/36 cells were higher than these obtained in human cells under similar conditions (compare Figs 2B and 3B). It was also observed that the *trans*-replicase activities differed across different alphaviruses. Notably, the activation of Gluc and Fluc expression by ONNV replicase occurred only at very low level (Fig 3B). Combined with low absolute levels of Gluc expression (Fig. 3A) this indicates that ONNV *trans*-replicase was virtually inactive in *Ae. albopictus* cells. This cell-type

specific defect most likely reflects the fact that, in its natural cycle, ONNV is transmitted by *Anopheles* and not by *Aedes* mosquitoes (51). No boost in Fluc expression and only a very modest boost of Gluc expression were observed with the BFV *trans*-replicase (Fig 3B). Again, low activity may reflect the fact that BFV is mostly transmitted by *Culex annulirostris* or *Aedes vigilax* mosquitoes (52,53). Interestingly, a very low boost of Fluc expression was also observed for replicases of RRV and MAYV (Fig 3B), which are associated with *Culex annulirostris* and *Aedes vigilax* (54) or *Haemagogus* mosquitos (55), respectively. Thus, there appears to be at least some correlation between vector preference of an alphavirus and the activity of the corresponding *trans*-replicase in C6/36 cells. However, this correlation should not be over-emphasized as for RRV and MAYV the boost of Gluc expression (transcription) in C6/36 cells were relatively high (Fig 3B). Furthermore, alphaviruses can use different vectors for transmission (56) and these viruses are often capable of replicating in cultivated cells of *Aedes* mosquitoes even when the cells are not from a field-relevant vector species.

Consistent with the modest boost of Gluc expression, only very low levels of SG RNA were detected in cells transfected with the BFV *trans*-replicase (Fig 3C). *Trans*-replicases of SFV, CHIKV, RRV, MAYV, VEEV, SINV and EILV synthesized SG RNAs at high levels (Fig 3C). The highest SG RNA levels were observed for SINV, MAYV and SFV *trans*-replicases (Fig 3C), correspondingly the absolute levels of Gluc expression were also highest for these three *trans*-replicases (Fig 3A). Thus, expression of Gluc serves as a reliable marker for replicase-mediated transcription also in *Ae albopictus* cells. Interestingly, however, production of viral genomic RNA was the highest for the SINV and MAYV *trans*-replicases and reasonably high for the RRV replicase despite their relative low boosts of Fluc expression (compare Figs 3B and 3C). Hence, for some of the alphaviruses the boost of Fluc expression in *Ae albopictus* cells cannot be used as a reliable marker for levels of genomic RNAs generated by their *trans*-replicases (compare left panel of Fig 3B and Fig 3C). Consistent with our previous observations (45), levels of negative strand RNAs from transfected C6/36 cells were below the detection limit of northern blot analysis. This analysis also failed to detect any positive-strand viral RNA in cells transfected with the ONNV *trans*-replicase (Fig 3C) confirming that it is, at best, only weakly active in C6/36 cells.

The reduced boosts of reporter expression, the low levels of negative strand RNAs and the poor correlation of the boost in Fluc expression and the genomic RNA synthesis revealed by northern blot all indicate that *trans*-replicases of arboviruses are much less efficient in C6/36 cells than in human cells. When HEK293T and C6/36 cells were transfected with CMV-EGFP and Ubi-EGFP plasmids, respectively, a higher percentage of EGFP positive cells was obtained for HEK293T cells (approximately 43%) than for C6/36 cells (approximately 21%). Next, the Gluc marker in the HSPolI-FG-CHIKV and AlbPolI-FG-CHIKV plasmids was replaced with a ZsGreen marker. Experiments performed with the CHIKV *trans*-replicase revealed that approximately 12% of human but only 0.4% of mosquito cells become ZsGreen positive. At the same time the expression levels of ZsGreen in replication-positive human and mosquito cells were similar (S2 Fig, S3 Fig). Taken together, these data indicate that lower activities of *trans*-replicases in *Ae albopictus* cells were due to a reduced number of cells in which RNA replication was initiated, rather than low levels of replication per cell. Normalizing for transfection efficiency, it was estimated that the template RNA replication was initiated in ~28% of transfected HEK293T cells but only in ~1.9% of transfected C6/36 cells (Fig 3D).

Replicases are capable of cross-utilizing template RNAs in human cells.

The *trans*-replicase systems allow i) analysis of RNA replication activities for the various alphaviruses, independent of entry-related host cell restrictions and factors associated with translation, as well as ii) analyses in the absence of virus adaptation. These properties permitted the comparative analysis of templates originating from the same alphavirus (hereafter “homologous template” or “homologous combination”) to those of other alphaviruses

(hereafter “heterologous templates” or “heterologous combinations”). This allowed, for the first time, an extensive analysis of cross-utilization of RNA templates by alphavirus replicases.

In order to include the most distant known member of the genus *Alphavirus*, the fish-infecting salmonid alphavirus (SAV), a HSPolI-FG-SAV template was additionally constructed and used together with the nine templates described in the previous sections. However, it was found that none of the heterologous replicases was able to use the SAV template RNA. To characterize the reasons behind this effect, a working functional homologous combination of SAV replicase and template would be needed but as we were lacking the facilities to cultivate fish cells this could not be obtained. Therefore, the exact reasons why replicases of other alphaviruses lack the capacity to use SAV template RNA remain unknown. It can be speculated that these reasons may include use of unsuitable host cells (human instead of fish cells), differences in critical *cis*-sequences required for SAV replication, temperature (SAV is normally propagated at temperatures below 16°C) affecting formation of essential RNA secondary structures, and/or very high specificity of the SAV template to its own replicase.

In contrast to the SAV template, templates from other alphaviruses could be cross-utilized by heterologous replicases. In general, replicases of viruses belonging to the SFV complex had the capacity to use each other's templates (Figs 4A-E; S4 Fig). A correlation with the phylogenetic relationship of these viruses was also observed within the group. Thus, replicases of CHIKV and ONNV used each other's templates efficiently; furthermore, the use of CHIKV and ONNV templates by replicases of other alphaviruses was very similar (compare Figs 4A and 4B). These templates were also efficiently used by MAYV replicase and, to a lesser extent, by replicases of RRV and SFV. On HSPolI-FG-CHIKV the transcription efficiencies of RRV and SFV replicases were significantly lower than CHIKV replicase ($p < 0.0001$ for both of SFV and RRV). The same was also observed for HSPolI-FG-ONNV template which was transcribed significantly more efficient by ONNV replicase than by SFV or RRV replicases ($p < 0.001$ at both cases). In addition, compared to CHIKV replicase, the RRV replicase was significantly less efficient for replication of CHIKV and ONNV template RNAs (Figs 4A, 4B) ($p < 0.0001$ and $p < 0.001$ respectively). Template RNAs of RRV and SFV also behaved similar to each other (compare Figs 4C and 4D) and, with the exception of ONNV, were efficiently transcribed by replicases of viruses from the SFV complex. Replication of these template RNAs was also similar, except that CHIKV and MAYV replicases used the SFV template significantly more efficient ($p < 0.05$ for CHIKV and $p < 0.001$ for MAYV replicase) than the RRV template (compare Figs 4C and 4D). Again, with the exception of that of ONNV, the MAYV template was efficiently replicated by replicases from viruses belonging to the SFV complex. For transcription it was also noted that RRV and SFV replicases used this template significantly less efficient than the CHIKV replicase ($p < 0.01$ at both cases), indicating that the MAYV SG promoter is not optimal for SFV and RRV replicases (Fig 4E). Taken together, it can be concluded that viruses belonging to the SFV complex can replicate and transcribe each other's templates. In contrast, no replicase of the outgroup viruses was capable of comparable utilization of any of the SFV-complex templates. The highest replication efficiencies were observed for the SINV replicase on MAYV and SFV templates (S5 Fig). Utilization of the CHIKV and especially ONNV template by replicases of outgroup viruses was very inefficient (Figs 4A-D). Cross-utilization of SFV and SINV templates has been previously studied using corresponding replicon vectors and DI RNA type reporters. In contrast to our findings (Fig 4D) this analysis revealed that SINV replicase was virtually unable to use a SFV template (26). The differences probably originate from the use of different tools, including the use of self-replicating RNA as source of replicase, in the earlier experiments.

The utilization of RNA templates of outgroup viruses was clearly different. Surprisingly, the templates of these evolutionary distant alphaviruses (Fig 1C) behaved rather similar to each other. The SINV and BFV templates were efficiently used by replicases of all viruses except EILV, VEEV and ONNV (Figs 5A, 5B). The VEEV template was replicated well by all replicases except that of ONNV and at least three of the heterologous replicases

(BFV, CHIKV, and SFV) significantly outperformed the homologous one ($p < 0.05$ for BFV, $p < 0.01$ for CHIKV and SFV replicases). The boost of Gluc expression was, however, greatest for the homologous replicase ($p < 0.001$ compared to any heterologous replicase), an effect that may be the result of the lower cytotoxicity of VEEV non-structural proteins for human cells. Only the SINV and EILV replicases failed to transcribe the VEEV template (Fig 5C), likely because of the inability to use the VEEV SG promoter. Taken together, it could be concluded that in contrast to templates from viruses belonging to the SFV complex the templates of SINV, BFV and VEEV can be efficiently used, albeit with some exceptions, by replicases of different alphaviruses. Surprisingly, it was found that the same also applies to the template RNA of insect specific EILV. This template was efficiently used by replicases from all alphaviruses except VEEV (Fig 5D). Replication of the template by EILV and VEEV replicases was inefficient and not significantly different between the two ($p > 0.05$). In contrast, transcription of the template was clearly and significantly ($p < 0.001$) more efficient for homologous replicase (Fig 5D). Overall, the use of EILV template was very similar to that of SINV (compare Figs 5A and 5D), supporting the observation that these viruses are phylogenetically related (Fig 1C) and harbor similar secondary structures at the 5' end region of genome (S1 Fig).

In order to reveal the molecular basis of incompatibility of some replicase/template pairs an analysis of viral RNAs was performed. It was concluded from the reporter expression that the VEEV replicase cannot use the SINV template while the SINV replicase can only replicate, but not transcribe, the VEEV template (Fig 6A; S5 Fig). These effects were confirmed by analysis of the viral RNAs. The VEEV replicase was found to be unable to synthesize any detectable RNA using the SINV template while the SINV replicase efficiently synthesized VEEV negative and positive strand genomic RNAs but failed to synthesize SG RNA (Fig 6B). Similarly, analysis of reporter expression lead to the conclusion that the CHIKV template can be replicated by the SINV or BFV but not by the VEEV replicases and that none of them was able to use the CHIKV SG promoter (Fig 6A). Again, the data obtained using northern blot fully supported these conclusions (compare Figs 6A and 6B). In contrast to VEEV, the replicases of SINV, and to lesser extent of BFV, were indeed able to synthesize negative and positive genomic RNAs from the CHIKV template. At the same time, none of these heterologous replicases produced CHIKV SG RNA at detectable levels. Thus, the SG promoter of many alphaviruses is rather selective: the VEEV replicase cannot use the SG promoter of SINV, and the SINV and BFV replicases cannot use the SG promoter of CHIKV. The effect was not reciprocal as the CHIKV replicase used the SG promoters of SINV and BFV as efficiently as the homologous replicases (Figs 5A, 5B, in both cases $p > 0.05$).

Alphavirus replicases display lower capacity to use heterologous templates in *Aedes albopictus* cells.

Previous studies have shown that *cis*-active sequences and/or RNA secondary structures in alphavirus RNAs may have different functionalities in vertebrate and mosquito cells (23,33,57). Therefore, the cross-utilization experiments described in the section above were also performed in *Ae. albopictus* cells. These experiments confirmed that the ONNV replicase was essentially inactive in C6/36 cells (Figs 7 and 8) because the boost of Fluc expression was typically undetectable and the boost of Gluc expression did not exceed 2-3-fold. This finding contrasts sharply with the observation in human cells where the ONNV replicase, albeit typically less efficient than replicases of other viruses, was able to boost Fluc expression approximately 10-fold and Gluc expression >1000-fold (Figs 4A, 4B). The difference in reporter gene expression observed between human and mosquito cells appears too large to be solely attributed to the less efficient initiation of replication in C6/36 cells (Fig 3D) and therefore presumably originate from some intrinsic property of ONNV. At the same time, replicases of CHIKV and MAYV used the ONNV template efficiently (Fig 7B). Thus, the replication defect of ONNV in C6/36 cells was due to the virus replicase and not the template RNA.

Cross-utilization of template RNAs of viruses belonging to the SFV complex in C6/36 cells was similar to that in human cells except that differences between alternative replicases were more pronounced, possibly due to a lower efficiency of *trans*-replicases in C6/36 cells. Templates of CHIKV and ONNV were efficiently replicated and transcribed by CHIKV and MAYV replicases. CHIKV template was used, albeit less efficient, also by the replicase of SFV. The RRV replicase was virtually unable to use either of these templates (Figs 7A, 7B). In contrast, the templates of SFV, RRV and MAYV were similarly and efficiently replicated and transcribed by all viral replicases (except the one from ONNV) of the SFV complex (Figs 7C-7E). For the replicases of RRV and MAYV it was observed that the boost of Fluc expression from the homologous templates was relatively modest and replication of heterologous templates was often much more efficient (S6 Fig). However, the significance of this, if any, is not clear as the effect probably originates from the low sensitivity of the Fluc reporter-based replication assay in C6/36 cells (Fig 3B). No replicase from outgroup alphaviruses was capable of using template RNAs from the SFV complex (Figs 7A-7E).

In C6/36 cells, the SINV template was used in the same way as in human cells. It was efficiently replicated by several heterologous replicases, among which the replicases of CHIKV, MAYV and SFV significantly outperformed the homologous replicase ($p < 0.05$, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). These three replicases were also efficient in SINV template transcription though for this their activities were significantly lower than that of homologous replicase ($p < 0.01$ in all three cases). In contrast to human cells, where the SINV template was also efficiently replicated and transcribed by the RRV replicase, this replicase performed poorly in C6/36 cells (Fig 8A). The template of BFV was in general less efficiently used than other templates. It was replicated relatively efficiently only by replicases of CHIKV and SFV. However, replicases of viruses from the SFV complex (except ONNV), the homologous replicase and that of VEEV transcribed the BFV template (Fig 8B). The VEEV template was efficiently used only by its own replicase and, to a smaller extent, by replicases of viruses from the SFV complex (Fig 8C). Although a similar trend was observed in human cells (Fig 5C), it was evident that in C6/36 cells the VEEV template is preferentially transcribed by the homologous replicase.

The EILV template RNA was efficiently used by SINV, CHIKV, MAYV and SFV replicase and poorly by the VEEV replicase. Unlike the situation in human cells, it was also poorly used by the replicase of BFV, RRV and ONNV (Fig 8D). It was also observed that while the EILV replicase was very active using the homologous template, it failed to use the templates of BFV, VEEV and viruses from SFV complex (S7 Fig). The only heterologous template used by EILV replicase to any extent was that of SINV (Fig 8A, S7 Fig). Thus, in contrast to the promiscuous utilization of EILV template RNA, the EILV replicase has a limited capacity to use heterologous templates.

In summary, our findings revealed similarities and differences of template RNA use in human and *Ae albopictus* cells. In general, in C6/36 cells alphavirus replicases had a reduced capacity to use templates other than their own. This was less pronounced for viruses belonging to the SFV complex but very clear for replicases of outgroup viruses, none of which could use templates of viruses from the SFV complex. It was clear that in C6/36 cells, the replicases of SINV, BFV, VEEV and EILV could typically replicate and transcribe only homologous template RNAs. The only exception was that the SINV replicase could also use the template RNA of EILV (S7 Fig).

Determinants for specificity of alphavirus template RNA map to its 5' region and SG promoter.

In the *trans*-replicase system, replication of the CHIKV template by the SINV replicase was inefficient and no synthesis of SG RNA was observed (Fig 6). At the same time the replicase of CHIKV was capable of using the SINV template efficiently (Fig 5A; S4 Fig). Thus, the cross-utilization of templates by the CHIKV and SINV replicases is, as already described for

SFV and SINRV (26), not reciprocal. Therefore, the CHIKV and SINRV templates were chosen for mapping the determinants important for their use by their corresponding replicases.

To increase the sensitivity of the assay subsequent experiments were performed in U2OS cells that have been found to be the most efficient for CHIKV (43) and SINRV *trans*-replicase assays. The 5' regions in the CHIKV and SINRV templates used in previous experiments had different lengths, i.e. 307nt for CHIKV and 401nt for SINRV. The differences mostly originate from the extra 105nt derived from the nsP1 ORF that were included into the SINRV template. Even though this sequence has no known function for alphavirus RNA replication/transcription, we wanted to exclude any possible bias caused by the presence or absence of this region. Therefore, an HSPolII-FG-C*CC plasmid, extending the CHIKV template 5' region to an extent similar to the SINRV template, was constructed. It was found that the template RNAs encoded by HSPolII-FG-C*CC and HSPolII-FG-CHIKV were both replicated and transcribed with high efficiency by the CHIKV replicase and with low efficiency by the SINRV replicase, and no statistically significant difference between two templates was observed for either replicase.

HSPolII-FG-C*CC and HSPolII-FG-SINRV were subsequently used for swapping the 5' regions, SG promoters and 3' regions, resulting in six swapped CHIKV/SINRV template constructs (Fig 9A). As expected, the CHIKV replicase was able to replicate and transcribe not only the SINRV and CHIKV template RNAs but also all six swapped variants (Fig 9B), confirming that it does not discriminate between *cis*-elements in the homologous template and these in the SINRV template. At the same time, the SINRV replicase replicated and transcribed its own template at high efficiency but was much less efficient on the CHIKV template (Fig 9C). Replacement of the 3' region of SINRV with that of the CHIKV template (resulting in S-S-C template) did not reduce the ability of the SINRV replicase to use the template (Fig 9C, compare S-S-S and S-S-C). Similarly, swapping of 3' region of the CHIKV template with its counterpart from SINRV (resulting in C*-C-S template) did not increase the utilization by the SINRV replicase (Fig 9C, compare C*-C-C and C*-C-S). These findings demonstrate that the 3' regions of the CHIKV and SINRV templates do not contain any major determinants for SINRV replicase specificity. In contrast, swapping of the SINRV SG promoter with that of CHIKV drastically diminished the ability of the SINRV replicase to transcribe the resulting S-C-S template while replication was slightly but significantly increased (Fig 9C compare S-S-S and S-C-S). The reciprocal swap increased transcription and also significantly reduced the replication of the resulting C*-S-C template by the SINRV replicase (Fig 9C, compare C*-C-C and C*-S-C). Taken together these findings confirm that the SINRV replicase has a strong preference for its own SG promoter. Furthermore, our data suggests that there may be competition between genomic and SG promoters that leads to reduced replication of the C*-S-C template and somewhat increases replication of the S-C-S template. Consistent with findings using the SFV and SINRV templates (26), swapping of their 5' regions had a major effect on replication of corresponding RNAs by the SINRV replicase. The C*-S-S template was used very inefficiently while the S-C-C template was replicated by the SINRV replicase as efficiently as SINRV's own template RNA (Fig 9C). Thus, the 5' region of the RNA template contains determinants for replication by the SINRV replicase.

Next, we wanted to analyze whether these findings also apply for pair of alphaviruses belonging to the SFV complex. Advantage was taken from the finding that both replication and transcription of the CHIKV template by the RRV replicase occurred only at a modest level (Fig 4A). Furthermore, use of the RRV template by the CHIKV replicase was also clearly less efficient than its utilization by the RRV replicase, the difference being especially evident for replication (Fig 4C). It was found that these phenotypes were also preserved in U2OS cells (Fig 9D, 9E). The use of swapped templates again revealed that replacement of the 5' region of the template with its counterpart from a related alphavirus significantly reduced replication of such a template. Replacement of the SG promoter of CHIKV in C-C-C template with that of RRV did not have a significant effect on transcription of such templates. Reciprocal substitutions in

the RRV templates somewhat reduced their transcription by the RRV replicase. The observed differences reached statistical significance only in case of the R-C-C and C-C-R templates. The C-C-R template was also characterized by reduced replication, thus its reduced transcription may, at least in part, be due to the swap of the 5' region. The R-C-C template on other hand, replicates similar to the R-R-R template and its reduced transcription is likely due to the presence of a heterologous SG promoter. Finally, swapping of the 3' region of the templates had no detectable effect on replication or transcription of such templates by the CHIKV or RRV replicases (Figs 9D, 9E). Taken together, these experiments confirmed that the determinants responsible for preferential use of templates by replicases of viruses belonging to the SFV complex are also located at the 5' region of the template RNA.

The beginning of the 5' UTR contains determinants required for efficient replication of RNA templates by SINV replicase.

Analyses of SINV/SFV chimeric templates have previously convincingly demonstrated that replacement of the SINV 5' UTR with that of SFV drastically reduces the use of the resulting template by the SINV replicase (26). To analyze whether the same applies for SINV/CHIKV chimeras we took advantage of the SHAPE derived and reverse genetically-verified structure of the 5' end of the CHIKV genome (33) and designed hybrid templates shown in Fig 10A. It was found that templates where the SL3 and SL47 regions (ccs-S-S), the SL3 and the nsP1 ORF regions (csc*-S-S) or only the SL3 region (css-S-S) originated from CHIKV were inefficiently replicated by the SINV replicase, similar to the C*-C-C and C*-S-S templates. In contrast, all chimeric templates that contained the SINV 5' sequences to the end of the SL3 element (ssc*-S-S, scc*-S-S and scs-S-S) were replicated as efficiently as the SINV template by the SINV replicase. Thus, in order to replicate the SINV/CHIKV chimeric templates efficiently, the SINV replicase needs homologous sequences located at the 5' end of the template and/or in SL3. Consistent with earlier findings (32) the sequences of the SINV 5' UTR downstream of nucleotide 45 had little, if any, impact on the replication efficiency.

The comparison of the 5' ends of the efficiently replicated S-S-S template and the very inefficiently replicated css-S-S template highlighted that the former is longer due to three insertions of 1 (T, position 3), 4 (TATT, positions 21-25) and 14 (ACAGCCGACCAATT, positions 32-45) nucleotides (Fig 10A). Therefore, we hypothesized that the shorter length of the 5' UTR may be the reason for the low replication efficiency of the css-S-S template. Indeed, adding the 14 nucleotide fragment to this template resulted in significant increase of its replication efficiency. However, the reciprocal mutation, resulting in the S^{Δ14}-S-S template, had no effect on the replication of the truncated SINV template. This contrasts with the previous findings indicating that deletions of nucleotides 36 or 37 results in an impaired, temperature-sensitive, phenotype (32). The addition of 4 nucleotides to the css-S-S template or their removal from the S-S-S template had minimal, if any, effect on their replication efficiencies. A similar lack of effect has been previously observed for analogous mutations introduced in the SINV genome (32). In sharp contrast, deletion of a single nucleotide from position 3 of the SINV template drastically reduced the replication efficiency of the resulting RNA (Fig 10C). Deletion of a single nucleotide from position 5 of the SINV template RNA results in a very similar effect (26) and deletion of residues 2-4 of the SINV genome is lethal for the virus (32). Thus, it should be concluded that the length and/or sequence of the 5' extreme of SINV genome is crucial for the use of the template RNA by the SINV replicase. Interestingly however, experiments using the css-S-S template only partly confirmed this hypothesis. Addition of a T residue after nucleotide 2 in the construct for expression of this template RNA resulted in a minor but significant increase of its replication efficiency. The same was observed when this change was combined with the addition of a 14nt sequence. Only the addition of a third missing element, the TATT sequence, resulted in a prominent increase of the replication efficiency of the corresponding template RNA (Fig 10C). This data indicates that for conversion of the CHIKV-type template to the SINV-type the synergistic effect of several insertions was required. All the

effects described above were specific for the SINV replicase as the CHIKV replicase used all templates shown in Fig 10A with high and very similar efficiencies.

The *trans*-replicase assays, though very efficient and sensitive, are based on an artificial system. To exclude the possibility that the observed effects may represent artifacts of the system we introduced the selected mutations into an infectious cDNA plasmid of SINV resulting in plasmids designated pToto1101^{ΔT}, pToto1101^{css} and pToto1101^{cT/TATT/14ss}. When the effects of the introduced mutations were analysed using an infectious centre assay (ICA) it was found that transcripts from pToto1101^{cT/TATT/14ss} had an infectivity of 1.3x10⁴ PFU/μg RNA which was only slightly lower than the infectivity of transcripts from wild type pToto1101 (4.0x10⁴ PFU/μg RNA). The infectivity of transcripts from pToto1101^{ΔT} was strongly reduced (1.5x10³ PFU/μg RNA) and that of transcripts from pToto1101^{css} was close to the limit of detection of the assay (<20 PFU/μg RNA). Thus, the infectivity of transcripts correlated, at least in terms of rank order, with the observed replication efficiencies of the corresponding templates in the *trans*-replication assay (Figs 10B, 10C). Furthermore, the difference observed between transcripts of pToto1101^{ΔT} and these of pToto1101^{css} may reflect the complexity of reversions/adaptations. For pToto1101^{ΔT} transcripts, an addition of a single U residue to the 5' end of the RNA will restore its length and generate wild type like sequence. Addition of A and U residues to the ends of imperfect genomes is an adaptation commonly found in alphaviruses (58). In contrast, in order to increase replication of the css-S-S template at least three insertions, none of which had major effect on its own, were required (Fig 10C). Apparently, re-creating the recovery pathway – or, more likely, creating one of its own – was more time consuming and this was reflected in low infectivity of corresponding transcripts. Whatever solution(s) were developed by mutant viruses they were clearly effective as all recombinant viruses grew to high final titres (>2.5x10⁸ PFU/ml) that were similar to these of wild type SINV. No correlation between the final titres and the efficiency of the corresponding template replication was observed.

Discussion

Trans-replicases were developed for nine alphaviruses across the *Alphavirus* genus. Compared with actual viruses these represent safe and easy-to-use systems. *Trans*-replicases of viruses of different origin can be used in the same cell types and the relative ease of quantifying reporter enzyme levels, compared with viral RNA levels, allows use of the system for studies that generate large panels of data, such as screening for antiviral compounds or for host factors essential for virus replication. The sensitivity of the *trans*-replication system depends on the amplitude of “boost” of marker expression. The “boost” was always larger for transcription marker (Gluc) expression and, in general, showed an excellent correlation with the actual SG RNA production (Fig 2, 3, 6). Nevertheless, it should be noted that the RNA/marker protein ratio is susceptible to the virus-induced shutoff of cellular transcription and translation that may be captured by *trans*-replicases or be host cell type specific. Compared to Gluc, the boost of the replication marker (Fluc) was almost always smaller. In human cells, however, it was prominent enough to serve as proxy of viral genomic RNA synthesis (Fig 6). In mosquito cells the boost of Fluc is low or modest and its correlation with genomic RNA synthesis is less pronounced (Fig 3) generally hampering comparison of different viruses. It is, however, still useful for comparison of the effects of mutations introduced into replicase of a specific alphavirus (45). Furthermore, the low boost of Fluc expression makes it useful for analysis of mutations or other effects that increase replication efficiency (59). In this study several heterologous replicase/template combinations that resulted in increased RNA replication in mosquito cells were revealed: RRV replicase replicated MAYV template ~90-fold more efficiently and MAYV replicase replicated EILV template ~40-fold more efficiently than their own templates (S6 Fig). Accordingly, this *trans*-replication assay could be applied for analysis of molecular mechanisms behind these effects. Taken together, certain limitations of *trans*-replication assay may, depending on circumstances, also be regarded as benefits.

The new tools were used to assess the compatibility of template RNAs and replicases of different alphaviruses in human and *Ae albopictus* cells. Our analysis of determinants allowing efficient use of template by SINV replicase (Figs 9, 10) correlated well with data previously obtained using infectious virus (32) or alphavirus replicons and DI RNA templates (26). The high degree of correlation indicates that the alphavirus *trans*-replication system is not only useful for analysis of alphavirus proteins (45,60,61) and to study the importance of host factors (44,62) but is also fully suitable to study the interactions between alphavirus replicases and template RNAs. Several previously unknown properties, revealed in this study, considerably expand our understanding regarding the alphavirus replication process and may provide novel insight in the phylogeny of the genus.

One of the key findings in this study is that replicases of alphaviruses from the SFV complex can use RNA templates from each other as well as those from outgroup viruses. We recently demonstrated that SL structures located in the 5' region of the CHIKV template RNA are essential for genome replication, indicating that they are recognized by components of CHIKV replicase complex (33). The determinants of sequence specificity for viruses from the SFV complex are also located at the 5' region of the template RNA. The determinants of RRV are preferentially recognized by the RRV replicase and reduce the utilization of the corresponding template by the CHIKV replicase, while the determinants located at the 5' region of the CHIKV template have an opposite effect. Interestingly, SL structures located in 5' regions both CHIKV and RRV are predicted to be extremely homologous (S1 Fig), suggesting that determinants of template selectivity for these replicases are most likely associated with primary RNA sequence rather than secondary structure. The situation with template RNAs of outgroup viruses is somewhat different: the SINV template accommodates both SINV and CHIKV replicases. The secondary structures at the 5' ends of genomes of outgroup viruses were predicted (S8 Fig) to be thermodynamically less stable (from -28.9 to -50.0 kJ/mol) than those at the 5' ends of genomes of viruses from SFV complex (from -53.1 to -75.3 kJ/mol). However, no obvious correlation was observed between the capacity of replicase to use a heterologous template and stability of the secondary structure at its 5' end (S4 Fig, S5 Fig, S8 Fig). Interestingly, small changes in 5' end of SINV template RNA could dramatically reduce its use by the homologous replicase even in the absence of an impact on the stability of secondary structures (S8 Fig). Furthermore, the predicted secondary structure of the 5' extreme of S-S-S and c^{T/TATT/14}ss-S-S template RNAs (that are efficiently used by SINV replicase) are similar to those of their inefficiently used counterparts, S^{ΔT}-S-S and c^{T/14}ss-S-S (S8 Fig). This raises the possibility that the determinants required for use as template RNAs in general are different from those required for recognition by specific replicases. Evidence suggests that the former acts via a mechanism involving multiple RNA secondary structure elements, while the latter is likely based on RNA length and/or primary sequence.

Another interesting, yet still unanswered, question is whether the ability of alphaviruses to use different templates represents a biological advantage or a restriction. We have previously demonstrated that the replicase of SFV can use cellular RNAs in order to generate double-stranded RNAs that are recognized by RIG-I and induce expression of type-I interferons (63). The efficiency of synthesis of such RNAs is different for different alphaviruses, being much higher for the SFV and SINV replicases than for the replicase of RRV (64). Thus, the ability of the replicase to synthesize such interferon-inducing RNAs does not correlate with the ability of the replicases of these viruses to use heterologous templates (Figs 4, 5, 6). Furthermore, experiments with the SAV-template clearly demonstrate that the ability of alphavirus replicases to use heterologous RNAs as templates has its limits. CHIKV and MAYV have been shown to be able to co-infect mosquitoes, at least in the laboratory (65). Co-infection of mosquitoes by different arboviruses creates the possibility of co-transmission from mosquito to human (66). Co-infection can also occur if humans are bitten by mosquitoes carrying different alphaviruses. A study from Kenya revealed that 38% of people who had been exposed to ONNV and/or CHIKV have, in fact, been exposed to both of them (67). Given the similarity between these

viruses and findings that a CHIKV vaccine (and, presumably, CHIKV infection) confers protection against ONNV (2,68) it seems plausible that many of these people have been co-infected by these viruses. The ability of alphaviruses to cross-utilize each other's templates, both in human and mosquito cells, can facilitate recombination between virus genomes, ensuring that resulting recombinant RNA genomes can be used by replicase(s) of parental viruses or by chimeric replicase created as a result of the recombination. Thus, while the benefits from the ability to cross-utilize templates of other alphaviruses are not obvious for an individual infection event, the ability may represent a potential factor for alphavirus evolution and may be the key for successful recombination between distantly related members of the genus. Cross-utilization of templates in mosquito cells, coupled with the promiscuous nature of template RNA of mosquito-specific alphaviruses, creates the possibility of recombination between divergent alphaviruses. This may include recombination between mosquito-specific and arbovirus members of the genus, potentially leading to novel viruses of either type. The increase of our knowledge about mosquito-specific alphavirus genomes may reveal if such recombination events have occurred and what type of viruses originated from such events.

The ability of the alphavirus replicase to specifically recognize its own 5' UTR and SG promoter elements in the template RNA indicates that some component(s) of the virus replicase are capable of recognizing primary sequence motifs and/or secondary structures. The helicase region of CHIKV nsP2 has been co-crystallized with an RNA oligonucleotide corresponding to the 3' end of the CHIKV genome (61). However the interaction of this protein with RNA is not sequence-specific and, based on our data (Fig 9), alphavirus replicases do not differentiate between each other's 3' UTR sequences. Specific interactions with sequences corresponding to both UTR regions and the SG promoter have been reported for the central domain of nsP3 (69). Nevertheless, the strongest candidate as a specificity factor for template recognition is nsP4, the RNA polymerase subunit of the replicase. Its ability to bind viral RNAs is dependent on other ns-proteins but clearly occurs in a very specific manner, i.e. it is possible to block the interaction of nsP4 with the SG promoter without affecting its interaction with the genomic promoter (29,30). Unfortunately, recombinant nsP4 of CHIKV has very low solubility and activity (70), which complicates *in vitro* analysis of nsP4-RNA interactions. It is also of great interest to reveal which RNA elements – sequences, secondary structures and/or long-range interactions - are crucial for specific template recognition. As alphavirus RNA can adopt alternative secondary structures (33), which most likely change in response to the interaction with different host and viral components, advantage could be taken of novel methods, allowing analysis of RNA structures and RNA-RNA interactions inside the cells. For such analysis, the *trans*-replicase system allows manipulation of sequence and secondary structures of template RNAs in a more efficient way than using infectious virus genomes.

It was observed that the *trans*-replicase of ONNV has low activity in human cells. It is possible that the poor activity of its *trans*-replicase may reflect a natural property of ONNV, or at least of the ONNV isolate used in this study. Interestingly, ONNV replicates reasonably well in C6/36 cells, a property that contrasts sharply with a near complete lack of activity of its *trans*-replicase in these cells. We have previously observed such a combination for *trans*-replicase/infectious virus of CHIKV harbouring mutations accelerating processing of P123 polyprotein precursor (59). Most likely these findings are linked and represent a consequence of an additional hurdle for the formation of functional replicase complexes by *trans*-replicase - compared to those of infectious virus. Here we have revealed that such a hurdle, likely involving finding and binding template RNA provided *in trans*, has a much more prominent effect in *Ae albopictus* than in human cells (Fig 3D). Interestingly, alterations in the speed of P123 processing also has a much stronger impact on the *trans*-replicase activity in mosquito cells than in human cells (59). The cell type specificity of this effect strongly argues for involvement of cell-specific conditions and/or cell-specific factors. Thus far the only known host factor present in both human and mosquito cells and absolutely required for the replication of CHIKV and ONNV is G3BP and its mosquito ortholog called Rasputin (44). These proteins interact

with the C-terminal region of nsP3 of Old World alphaviruses (71,72). Interestingly, a CHIKV *trans*-replicase harbouring mutant nsP3 which is unable to interact with Rasputin, is virtually inactive in C6/36 cells (44) and therefore similar to the *trans*-replicase of ONNV. However, ONNV nsP3 does have sites for interaction with Rasputin and ONNV is competent for replication in mammalian cells that express G3BP. It is plausible that ONNV replicase can bind *Ae albopictus* Rasputin but uses it efficiently only in the context of infectious virus and not in the context of the *trans*-replicase. Thus, the replication defect, albeit detected in an artificial system, may actually be connected to the most important *in vivo* property of ONNV i.e. its transmission by *Anopheles* mosquitoes. Interestingly, the determinant of infection rates in *Anopheles gambiae* has also been mapped to nsP3 of ONNV (51). Thus, this study adds another important piece of information to the puzzle regarding alphavirus nsP3, host G3BPs/Rasputin proteins and the mechanism(s) surrounding the formation and functioning of virus replicase complexes and ultimately its impact on alphavirus vector transmission. *Trans*-replicase systems, that reproduce, and possibly even emphasise, natural properties of alphavirus replicases, represent a valuable tool for studying such interactions.

Interesting findings were also obtained for EILV. Firstly, in sharp contrast to the template RNA of fish-infecting SAV, the template of mosquito-specific EILV was efficiently used by replicases of arbovirus members of alphaviruses in both mosquito and human cells. At the same time, EILV replicase was highly specific to its own template RNA. Both of these properties are similar to SINV, furthermore replicases of both viruses were able to use each other's templates better than any other heterologous template. It is plausible that these functional similarities originate from the phylogenetic relationship between these viruses (Fig 1C) and similar folding of 5' regions of these template RNAs (S1 Fig). This raises an intriguing question: did a SINV-like ancestor lose its ability to replicate in vertebrates or did an EILV-like ancestor acquire the ability to replicate in a vertebrate host? The number of recognized insect-specific alphaviruses is rapidly increasing and the same is the case for other virus groups traditionally considered as arboviruses. Given that insect-specific viruses from these groups are widespread and abundant, they may represent ancestors of arbovirus members of corresponding groups. Here we show that, in order to become an arbovirus, they do not need to acquire the ability of replicating in mammalian cells: this activity already exists - at least for EILV (Fig 2). Increased replication efficiency and adaptation to elevated temperatures are effects frequently observed for alphavirus temperature sensitive mutants propagated in cell culture; consequently, it seems plausible that insect-specific alphaviruses have, perhaps repeatedly, adapted to infection of vertebrate hosts. Thus, *trans*-replicase assays are versatile tools to examine the poorly understood relationship between insect-specific viruses and arboviruses that cause infections in humans.

As template switching by the viral replicase represents the most efficient mechanism for recombination between viruses, the potential for cross-utilization of templates could shed light on the mechanisms of (alpha)virus recombination and evolution. The *trans*-replication approach developed here is applicable to other virus families containing major human pathogens and/or emerging viruses such as *Picornaviridae*, *Flaviviridae* and *Coronaviridae*. *Trans*-replicases are flexible, easy to use systems that offer an alternative to study viral recombination and evolution when infectious clones are not available. Their use also eliminates the need for high containment facilities and allows convenient assessment of template cross-utilization, and thus potential for recombination, without the need for creating recombinant viruses in the lab.

Better understanding of the template RNA requirements of (alpha)virus replicases creates numerous possibilities. Promiscuous templates can be used for analysis of interactions between replicase proteins of (alpha)viruses, RNA-replicase interactions and for reconstruction of (alpha)virus replication complexes. Sub-optimal combinations of 5' UTR sequences and replicases can be used to generate recombinant attenuated viruses with potential use as vaccine candidates. The *trans*-replicases of alphaviruses can be used as tools for inducible expression

of proteins of interest. The use of replicases from Old World alphaviruses may be hampered by the cytotoxic effects of their nsPs. However, here we demonstrate that the less cytotoxic replicase of VEEV produces a comparable boost in protein expression via activity of the SG promoter (Fig 2). This property, likely shared by replicases of other New World alphaviruses, may be utilized for development of efficient expression systems with extremely high induced/uninduced expression ratios (i.e. ratio of expression levels with and without replicase). Furthermore, constructs expressing promiscuous templates can be used to obtain transgenic cell lines that can serve as universal biosensors of alphaviruses. This approach may be applied to the detection and identification of unknown alphaviruses, especially those belonging to the SFV complex and capable of using different RNA templates. Other virus families with *trans*-active replicases may take advantage of this technology. It may even be possible to extend this approach to transgenic mosquitoes, potentially providing rapid, robust biosensors not dependent on access to tissue culture facilities, and perhaps providing a new route to develop methods to modify wild vector populations with specific, engineered response elements to arboviruses allowing detection and/or reduced vector competence. Conversely, alphavirus group-specific templates and SG promoters can be utilized in biosensors that allow discrimination between alphaviruses belonging to different serocomplexes and potentially even between different species of alphaviruses. Finally, the critical sequences and RNA secondary structures required for replication are interesting new and potentially specific targets for antiviral interference with molecules such as locked nucleic acids and morpholino oligonucleotides.

Methods

Cells and viruses. U2OS human bone osteosarcoma cells (ATCC HTB-96) were maintained in Iscove's modified Dulbecco's medium (Gibco) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 2 mM L-glutamine at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. HEK293T cells (ATCC CRL-3216) were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with 2mM L-glutamine and 10% FBS at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. BHK-21 cells (ATCC CCL-10) were grown in Glasgow's minimal essential medium (Gibco) containing 10% FBS, 2% tryptose phosphate broth (TPB) and 200 mM HEPES pH 7.2 at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. *Aedes albopictus* derived C6/36 cells were maintained in Eagle's minimum essential medium containing 10% FBS at 28°C with no extra CO₂. All media were supplemented with 100 U/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin.

Plasmids. Plasmids containing native (not codon optimized) sequences encoding for P1234 of CHIKV (ECSA genotype, LR2006-OPY1 isolate) or its polymerase negative variant P1234^{GAA}, harboring GDD to GAA substitution in the active site of nsP4, under the control of immediately early promoter of human cytomegalovirus (CMV) have been previously described (43). Similar plasmids designed for the expression of P1234 of SFV (SFV4 strain), SINV (Toto1101 strain), RRV (RRV-T48 strain), MAYV (TRVL strain), ONNV (Chad isolate), BFV and VEEV (V3526 strain) as well as their polymerase negative variants in mammalian cells have also been described (44). The plasmid for expression of P1234 of EILV in mammalian cells has similar design. It was assembled from synthetic DNAs (GenScript, USA) and restriction fragments of corresponding infectious cDNA clone which was a gift from Scott Weaver (UTMB) (7); its polymerase negative variant was obtained using site-directed mutagenesis and sub-cloning procedures. For simplicity, and in order to avoid confusion with each other, these plasmids were designated as CMV-P1234-CHIKV, CMV-P1234^{GAA}-CHIKV and so on. To obtain constructs for expression of replicases in *Ae albopictus* cells, the P1234 encoding regions were cloned under the control of polyubiquitin promoter from *Aedes aegypti* as previously described for CHIKV *trans*-replicase (59); obtained clones were designated as Ubi-P1234-CHIKV, Ubi-P1234^{GAA}-CHIKV and so on.

Human RNA polymerase I promoter-based plasmids for the production of replication competent RNA templates of CHIKV (originally named HSPoII-Fluc-Gluc), SFV, ONNV,

SINV, RRV, BFV and VEEV have been previously described (44,45). The plasmids for expression of RNA templates of EILV and SAV had the same design and were assembled from synthetic DNA fragments (GenScript, USA). To obtain constructs for expression of corresponding template RNAs in *Ae albopictus* cells the design developed for CHIKV (originally named AlbPolI-Fluc-Gluc (45)), was adapted to all above listed alphaviruses except SAV. For simplicity these plasmids were designated as HSPolI-FG-CHIKV, AlbPolI-FG-CHIKV and so on. For detection of individual cells positive for RNA replication the *Gaussia* luciferase (Gluc) marker in HSPolI-FG-CHIKV and AlbPolI-FG-CHIKV was replaced with ZsGreen; resulting in vectors designated HSPolI-FZsG-CHIKV and AlbPolI-FZsG-CHIKV.

For making SINV/CHIKV swapped templates the region corresponding to the 5' end of CHIKV template RNA was extended from nucleotide 307 to nucleotide 412; obtained plasmid was designated as HSPolI-FG-C*CC. The swapping of 5' region (5' UTR+ region encoding for N-terminus of nsP1), SG promoter region and 3' region (truncated 3' UTR) between HSPolI-FG-C*CC and HSPolI-FG-SINV or HSPolI-FG-CHIKV and HSPolI-FG-RRV was performed using standard cloning procedures. Obtained constructs were designated as explained on Fig 9A, HSPolI-FG-SSS, HSPolI-FG-C*SS and so on. Corresponding template RNAs were designated as S-S-S, C*-S-S and so on. Note that plasmid designated as HSPolI-FG-CCC is the same as HSPolI-FG-CHIKV, HSPolI-FG-SSS is the same as HSPolI-FG-SINV and HSPolI-FG-RRR is the same as HSPolI-FG-RRV.

Plasmids for the expression of templates with changes in the 5' region were constructed using synthetic DNAs (GenScript, USA) and subcloning procedures. The first set of constructs contained swaps of SL3, SL47 regions and nsP1 ORF parts in template RNA encoded by HSPolI-FG-SSS (Fig 10A, left panel). The obtained plasmids were designated as HSPolI-FG-ssc*SS, HSPolI-FG-ccsSS and so on; the first small letter in the name of plasmid reflects the origin of the 5' extreme and SL3, second small letter reflects the origin of the region corresponding to CHIKV SL47; the third small letter reflects the origin of the region encoding the N-terminus of nsP1; c* indicates use of longer fragment of CHIKV nsP1 ORF. In the second set of plasmids the 5' ends and SL3 regions of templates encoded by HSPolI-FG-SSS and HSPolI-FG-ccsSS were modified as shown on Fig 10A (right panel). Constructs based on HSPolI-FG-SSS were designated as HSPolI-FG-S^{ΔT}SS, HSPolI-FG-S^{ΔTATT}SS and HSPolI-FG-S^{Δ14}SS; constructs based on HSPolI-FG-ccsSS were designated as HSPolI-FG-c^TssSS, HSPolI-FG-c^{TATT}ssSS, HSPolI-FG-c¹⁴ssSS, HSPolI-FG-c^{T/14}ssSS and HSPolI-FG-c^{T/TATT/14}ssSS.

Plasmid pToto1101 was used to construct infectious cDNA clones of SINV harbouring modifications in the 5' UTR. The deletion of a residue corresponding to the position 3 of SINV genome was performed using site-directed mutagenesis and subcloning procedures, corresponding plasmid was designated pToto1101^{ΔT}. Replacements identical to these used in HSPolI-FG-ccsSS and HSPolI-FG-c^{T/TATT/14}ssSS template-RNA encoding plasmids were made using synthetic DNAs (GenScript) and subcloning procedures; obtained plasmids were designated pToto1101^{css} and pToto1101^{cT/TATT/14ss}, respectively.

Sequences of all plasmids were verified using Sanger sequencing and are available from the authors upon request.

Rescue of recombinant viruses. Virus rescue in BHK-21 cells and ICA were performed as previously described (73). Briefly, BHK-21 (8×10⁶) were transfected with *in vitro* transcripts by electroporation with a Bio-Rad Gene Pulser II unit (two pulses at 850 V and 25 μF) in 0.4 cm cuvettes (Thermo Fisher Scientific). After 2 h of incubation at 37°C, the cells were overlaid with 2 ml of GMEM supplemented with 2% FBS and containing 1% BactoTM agar (BD Biosciences). For virus rescue experiments virus stocks were collected at 24 h (wild type and pToto1101^{cT/TATT/14ss}) or at 48 h (pToto1101^T and pToto1101^{css}) post transfection (p.t.). Obtained stocks were clarified by centrifugation at 3000xg for 10 minutes and virus titers were determined using standard plaque assay on BHK-21 cells.

Trans-replication assay. The *trans*-replication assay in U2OS, HEK293T and C6/36 cells was performed as previously described (59). In order to determine the optimal time point for

analysis of reporter expression, the HEK293T and C6/36 cells were transfected with homologous pairs of plasmids (1 µg of plasmid encoding for template RNA and 1 µg of plasmid encoding for corresponding replicase) using Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Transfected cells were incubated at 37°C (HEK293T) or 28°C (C6/36). For HEK293 cells 10 µl aliquots of growth media were collected at 4, 8, 12, 16, 20, 22, 24 and 48 h p.t.; for C6/36 cells the samples were collected at 12, 24, 36, 48, 54, 66, 72 and 144 h p.t. The activity of secreted Gluc was measured using the *Renilla* luciferase assay system (Promega).

U2OS cells grown on 12-well plates were co-transfected with 1 µg of HSPolI-FG-CHIKV or other plasmid encoding for template RNA and 1 µg of CMV-P1234-CHIKV or other plasmid encoding for replicase; in control cells the later was replaced with plasmid encoding a polymerase negative version of replicase protein (CMV-P1234^{GAA}-CHIKV and so on). Transfected cells were incubated at 37°C for 18 h. In experiments involving HSPolI-FG-EILV and CMV-P1234-EILV plasmids the transfected cells were also incubated at 28°C for 48 h. All experiments were repeated at least three times.

For HEK293T and C6/36 cells the *trans*-replication assay carried out using 96-well plate format. Briefly, approximately 35,000 cells per well were co-transfected with 0.05 µg of the template and 0.05 µg of appropriate replicase expression plasmids; in control cells the later was replaced with a plasmid expressing the polymerase negative version of replicase. Transfections were performed using Lipofectamine LTX reagent. HEK293T cells were generally incubated at 37°C for 18 h. HEK293T cells transfected using EILV cDNA derived plasmid as well as all transfected C6/36 cells were incubated at 28°C for 48 h. All transfections were performed in triplicate and experiments were repeated at least twice. After incubation, cells were lysed and firefly luciferase (Fluc) and Gluc activities were measured using the Dual-Luciferase-Reporter assay (Promega). Fluc and Gluc activities measured for cells transfected using plasmids expressing active replicases were normalized to these obtained for corresponding control cells.

Flow cytometry assay. HEK293T cells grown in 12-well plates were co-transfected with 1 µg of HSPolI-FZsG-CHIKV and 1 µg of CMV-P1234-CHIKV; C6/36 cells grown in 12-well plates were co-transfected with 1 µg of AlbPolI-FZsG-CHIKV and 1 µg of Ubi-P1234-CHIKV. Control HEK293T cells were transfected with 1 µg of plasmid expressing EGFP from CMV promoter (CMV-EGFP) and control C6/36 cells were transfected with 1 µg of plasmid expressing EGFP from polyubiquitin promoter (Ubi-EGFP). Transfections were performed in triplicate using Lipofectamine LTX reagent. At 18 h (HEK293T) or 48 h (C6/36) p.t. cells were collected in 500 µL PBS and analyzed with an Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer. For each sample 30,000 events were recorded. The acquired data was analyzed using Attune NxT software.

Northern blotting. HEK293T and C6/36 cells grown in 12-well plates were co-transfected with 1 µg of template RNA expression plasmid and 1 µg of replicase expression plasmid using Lipofectamine LTX reagent; control cells were mock-transfected. At 18 h (HEK293T) or 48 h (C6/36) p.t. total RNA was extracted using TRIzol® reagent (Life Technologies). 2 µg of total RNA was used for detection of positive strands and 10 µg of total RNA was used for detection of negative strands. RNAs were denatured for 10 min at 70°C in 2X RNA loading dye (Thermo Scientific), cooled on ice and separated on a denaturing gel (1% agarose/6% formaldehyde) using 1X MOPS buffer. RNA was transferred to a Hybond-N+ filter (GE Healthcare) and fixed using a UV Stratalinker 1800 (Stratagene). Digoxigenin (DIG)-labelled RNA probe complementary to residues 42-390 of the sequence encoding for Gluc marker was used to detect positive-strand RNAs; probe corresponding to residues 51-376 of the sequence encoding for Fluc marker was used to detect negative-strand RNAs. Filters were hybridized overnight; blots were washed and developed according to the manufacturer's (Roche) protocols.

In silico analysis of RNA structure: *In silico* thermodynamic RNA structure and free energy predictions were carried out using UNAFOLD at 37°C on default settings (version 3.4) (74). RNA structures were visualised using the VARNA software package (75).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software. Data were analyzed using Student's unpaired one tailed t-test. P values of ≤ 0.05 (*), ≤ 0.01 (**), ≤ 0.001 (***) and ≤ 0.0001 (****) were used to represent degrees of significance for each mutant compared to wild-type. Each experiment was repeated to gain a minimum of 3 independent biological repeats. Raw data used to generate graphs is presented in Supporting File 9.

References

1. Burt FJ, Chen W, Miner JJ, Lenschow DJ, Merits A, Schnettler E, *et al.* Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(4):e107–17.
2. Rezza G, Chen R, Weaver SC. O'nyong-nyong fever: a neglected mosquito-borne viral disease. *Pathog Glob Health.* 2017 Sep;111(6):271–5.
3. Russell RC. Ross River virus: ecology and distribution. *Annu Rev Entomol.* 2002;47:1–31.
4. Forrester NL, Wertheim JO, Dugan VG, Auguste AJ, Lin D, Adams AP, *et al.* Evolution and spread of Venezuelan equine encephalitis complex alphavirus in the Americas. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Aug;11(8):e0005693.
5. Weaver SC, Salas R, Rico-Hesse R, Ludwig GV, Oberste MS, Boshell J, *et al.* Re-emergence of epidemic Venezuelan equine encephalomyelitis in South America. VEE Study Group. *Lancet Lond Engl.* 1996 Aug 17;348(9025):436–40.
6. Chen R, Mukhopadhyay S, Merits A, Bolling B, Nasar F, Coffey LL, *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. *J Gen Virol.* 2018 Jun;99(6):761–2.
7. Nasar F, Palacios G, Gorchakov RV, Guzman H, Da Rosa APT, Savji N, *et al.* Eilat virus, a unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Sep 4;109(36):14622–7.
8. Garmashova N, Gorchakov R, Volkova E, Paessler S, Frolova E, Frolov I. The Old World and New World alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. *J Virol.* 2007 Mar;81(5):2472–84.
9. Kim DY, Reynaud JM, Rasaloukaya A, Akhrymuk I, Mobley JA, Frolov I, *et al.* New World and Old World Alphaviruses Have Evolved to Exploit Different Components of Stress Granules, FXR and G3BP Proteins, for Assembly of Viral Replication Complexes. *PLoS Pathog.* 2016;12(8):e1005810.
10. Lundström JO, Pfeffer M. Phylogeographic structure and evolutionary history of Sindbis virus. *Vector Borne Zoonotic Dis Larchmt N.* 2010 Nov;10(9):889–907.
11. Weaver SC, Hagenbaugh A, Bellew LA, Netesov SV, Volchikov VE, Chang GJ, *et al.* A comparison of the nucleotide sequences of eastern and western equine encephalomyelitis viruses with those of other alphaviruses and related RNA viruses. *Virology.* 1993 Nov;197(1):375–90.
12. Allison AB, Stallknecht DE, Holmes EC. Evolutionary genetics and vector adaptation of recombinant viruses of the western equine encephalitis antigenic complex provides new insights into alphavirus diversity and host switching. *Virology.* 2015 Jan 1;474:154–62.
13. Rupp JC, Sokoloski KJ, Gebhart NN, Hardy RW. Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *J Gen Virol.* 2015 Sep;96(9):2483–500.
14. Lemm JA, Rümenapf T, Strauss EG, Strauss JH, Rice CM. Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *EMBO J.* 1994 Jun 15;13(12):2925–34.
15. Spuul P, Balistreri G, Kääriäinen L, Ahola T. Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. *J Virol.* 2010 Aug;84(15):7543–57.

16. Frolova EI, Gorchakov R, Pereboeva L, Atasheva S, Frolov I. Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. *J Virol.* 2010 Nov;84(22):11679–95.
17. Lulla V, Karo-Astover L, Rausalu K, Saul S, Merits A, Lulla A. Timeliness of Proteolytic Events Is Prerequisite for Efficient Functioning of the Alphaviral Replicase. *J Virol.* 2018 15;92(14).
18. Lulla A, Lulla V, Merits A. Macromolecular assembly-driven processing of the 2/3 cleavage site in the alphavirus replicase polyprotein. *J Virol.* 2012 Jan;86(1):553–65.
19. Meertens L, Hafirassou ML, Couderc T, Bonnet-Madin L, Kril V, Kümmerer BM, *et al.* FHL1 is a major host factor for chikungunya virus infection. *Nature.* 2019;574(7777):259–63.
20. Hyde JL, Chen R, Trobaugh DW, Diamond MS, Weaver SC, Klimstra WB, *et al.* The 5' and 3' ends of alphavirus RNAs--Non-coding is not non-functional. *Virus Res.* 2015 Aug 3;206:99–107.
21. Chen R, Wang E, Tsetsarkin KA, Weaver SC. Chikungunya virus 3' untranslated region: adaptation to mosquitoes and a population bottleneck as major evolutionary forces. *PLoS Pathog.* 2013;9(8):e1003591.
22. Stapleford KA, Moratorio G, Henningsson R, Chen R, Matheus S, Enfissi A, *et al.* Whole-Genome Sequencing Analysis from the Chikungunya Virus Caribbean Outbreak Reveals Novel Evolutionary Genomic Elements. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Jan;10(1):e0004402.
23. Morley VJ, Noval MG, Chen R, Weaver SC, Vignuzzi M, Stapleford KA, *et al.* Chikungunya virus evolution following a large 3'UTR deletion results in host-specific molecular changes in protein-coding regions. *Virus Evol* [Internet]. 2018 Jun 4 [cited 2019 Jun 17];4(1). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6007266/>
24. Sokoloski KJ, Dickson AM, Chaskey EL, Garneau NL, Wilusz CJ, Wilusz J. Sindbis virus usurps the cellular HuR protein to stabilize its transcripts and promote productive infections in mammalian and mosquito cells. *Cell Host Microbe.* 2010 Aug 19;8(2):196–207.
25. Strauss JH, Strauss EG. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev.* 1994 Sep;58(3):491–562.
26. Frolov I, Hardy R, Rice CM. Cis-acting RNA elements at the 5' end of Sindbis virus genome RNA regulate minus- and plus-strand RNA synthesis. *RNA N Y N.* 2001 Nov;7(11):1638–51.
27. Ou JH, Rice CM, Dalgarno L, Strauss EG, Strauss JH. Sequence studies of several alphavirus genomic RNAs in the region containing the start of the subgenomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Sep;79(17):5235–9.
28. Hertz JM, Huang HV. Utilization of heterologous alphavirus junction sequences as promoters by Sindbis virus. *J Virol.* 1992 Feb;66(2):857–64.
29. Li M-L, Stollar V. Identification of the amino acid sequence in Sindbis virus nsP4 that binds to the promoter for the synthesis of the subgenomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 22;101(25):9429–34.
30. Li M-L, Stollar V. Distinct sites on the Sindbis virus RNA-dependent RNA polymerase for binding to the promoters for the synthesis of genomic and subgenomic RNA. *J Virol.* 2007 Apr;81(8):4371–3.
31. Ou JH, Strauss EG, Strauss JH. The 5'-terminal sequences of the genomic RNAs of several alphaviruses. *J Mol Biol.* 1983 Jul 25;168(1):1–15.
32. Niesters HG, Strauss JH. Defined mutations in the 5' nontranslated sequence of Sindbis virus RNA. *J Virol.* 1990 Sep 1;64(9):4162–8.

33. Kendall C, Khalid H, Müller M, Banda DH, Kohl A, Merits A, *et al.* Structural and phenotypic analysis of Chikungunya virus RNA replication elements. *Nucleic Acids Res.* 2019 Jul 27;
34. Hyde JL, Gardner CL, Kimura T, White JP, Liu G, Trobaugh DW, *et al.* A viral RNA structural element alters host recognition of nonself RNA. *Science.* 2014 Feb 14;343(6172):783–7.
35. Shirako Y, Strauss EG, Strauss JH. Modification of the 5' terminus of Sindbis virus genomic RNA allows nsP4 RNA polymerases with nonaromatic amino acids at the N terminus to function in RNA replication. *J Virol.* 2003 Feb;77(4):2301–9.
36. Tsiang M, Monroe SS, Schlesinger S. Studies of defective interfering RNAs of Sindbis virus with and without tRNA^{Asp} sequences at their 5' termini. *J Virol.* 1985 Apr;54(1):38–44.
37. Levis R, Weiss BG, Tsiang M, Huang H, Schlesinger S. Deletion mapping of Sindbis virus DI RNAs derived from cDNAs defines the sequences essential for replication and packaging. *Cell.* 1986 Jan 17;44(1):137–45.
38. Thomson M, Dimmock NJ. Common sequence elements in structurally unrelated genomes of defective interfering Semliki Forest virus. *Virology.* 1994 Mar;199(2):354–65.
39. Gorchakov R, Hardy R, Rice CM, Frolov I. Selection of functional 5' cis-acting elements promoting efficient sindbis virus genome replication. *J Virol.* 2004 Jan;78(1):61–75.
40. Liljeström P, Garoff H. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnol Nat Publ Co.* 1991 Dec;9(12):1356–61.
41. Bredenbeek PJ, Frolov I, Rice CM, Schlesinger S. Sindbis virus expression vectors: packaging of RNA replicons by using defective helper RNAs. *J Virol.* 1993 Nov;67(11):6439–46.
42. Spuul P, Balistreri G, Hellström K, Golubtsov AV, Jokitalo E, Ahola T. Assembly of alphavirus replication complexes from RNA and protein components in a novel trans-replication system in mammalian cells. *J Virol.* 2011 May;85(10):4739–51.
43. Utt A, Quirin T, Saul S, Hellström K, Ahola T, Merits A. Versatile Trans-Replication Systems for Chikungunya Virus Allow Functional Analysis and Tagging of Every Replicase Protein. *PloS One.* 2016;11(3):e0151616.
44. Götte, Age Utt, Rennos Fragkoudis, Andres Merits, Gerald McInerney. Sensitivity of alphaviruses to G3BP deletion correlates with efficiency of replicase polyprotein processing. 2020 Jan 2;
45. Utt A, Rausalu K, Jakobson M, Männik A, Alphey L, Fragkoudis R, *et al.* Design and Use of Chikungunya Virus Replication Templates Utilizing Mammalian and Mosquito RNA Polymerase I-Mediated Transcription. *J Virol.* 2019 Sep 15;93(18).
46. Garmashova N, Gorchakov R, Frolova E, Frolov I. Sindbis virus nonstructural protein nsP2 is cytotoxic and inhibits cellular transcription. *J Virol.* 2006 Jun;80(12):5686–96.
47. Akhrymuk I, Frolov I, Frolova EI. Sindbis Virus Infection Causes Cell Death by nsP2-Induced Transcriptional Shutoff or by nsP3-Dependent Translational Shutoff. *J Virol.* 2018 Dec 1;92(23).
48. Sanz MÁ, Castelló A, Ventoso I, Berlanga JJ, Carrasco L. Dual Mechanism for the Translation of Subgenomic mRNA from Sindbis Virus in Infected and Uninfected Cells. Ryu W-S, editor. *PLoS ONE.* 2009 Mar 10;4(3):e4772.
49. Sanz MA, Castelló A, Carrasco L. Viral Translation Is Coupled to Transcription in Sindbis Virus-Infected Cells. *J Virol.* 2007 Jul 1;81(13):7061–8.
50. Tamm K, Merits A, Sarand I. Mutations in the nuclear localization signal of nsP2 influencing RNA synthesis, protein expression and cytotoxicity of Semliki Forest virus. *J Gen Virol.* 2008 Mar 1;89(3):676–86.

51. Saxton-Shaw KD, Ledermann JP, Borland EM, Stovall JL, Mossel EC, Singh AJ, *et al.* O'nyong nyong virus molecular determinants of unique vector specificity reside in non-structural protein 3. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(1):e1931.
52. Inglis TJJ, Bradbury RS, McInnes RL, Frances SP, Merritt AJ, Levy A, *et al.* Deployable Molecular Detection of Arboviruses in the Australian Outback. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 07;95(3):633–8.
53. Naish S, Mengersen K, Hu W, Tong S. Wetlands, climate zones and Barmah Forest virus disease in Queensland, Australia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012 Dec;106(12):749–55.
54. Liu X, Mutso M, Cherkashchenko L, Zusinaite E, Herrero LJ, Doggett SL, *et al.* Identification of natural molecular determinants of Ross River virus type I IFN modulation. *J Virol.* 2020 Jan 29;
55. Receveur MC, Grandadam M, Pistone T, Malvy D. Infection with Mayaro virus in a French traveller returning from the Amazon region, Brazil, January, 2010. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2010 May 6;15(18).
56. Brustolin M, Pujhari S, Henderson CA, Rasgon JL. Anopheles mosquitoes may drive invasion and transmission of Mayaro virus across geographically diverse regions. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Nov 7;12(11):e0006895.
57. Fayzulín R, Frolov I. Changes of the secondary structure of the 5' end of the Sindbis virus genome inhibit virus growth in mosquito cells and lead to accumulation of adaptive mutations. *J Virol.* 2004 May;78(10):4953–64.
58. Hardy RW, Rice CM. Requirements at the 3' end of the sindbis virus genome for efficient synthesis of minus-strand RNA. *J Virol.* 2005 Apr;79(8):4630–9.
59. Bartholomeeusen K, Utt A, Coppens S, Rausalu K, Vereecken K, Ariën KK, *et al.* A Chikungunya Virus trans-Replicase System Reveals the Importance of Delayed Nonstructural Polyprotein Processing for Efficient Replication Complex Formation in Mosquito Cells. *J Virol.* 2018 15;92(14).
60. Abraham R, Hauer D, McPherson RL, Utt A, Kirby IT, Cohen MS, *et al.* ADP-ribosyl-binding and hydrolase activities of the alphavirus nsP3 macrodomain are critical for initiation of virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Oct 15;
61. Law Y-S, Utt A, Tan YB, Zheng J, Wang S, Chen MW, *et al.* Structural insights into RNA recognition by the Chikungunya virus nsP2 helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Apr 18;
62. Carissimo G, Chan Y-H, Utt A, Chua T-K, Bakar FA, Merits A, *et al.* VCP/p97 Is a Proviral Host Factor for Replication of Chikungunya Virus and Other Alphaviruses. *Front Microbiol.* 2019;10:2236.
63. Nikonov A, Mölder T, Sikut R, Kiiver K, Männik A, Toots U, *et al.* RIG-I and MDA-5 detection of viral RNA-dependent RNA polymerase activity restricts positive-strand RNA virus replication. *PLoS Pathog.* 2013;9(9):e1003610.
64. Liu X, Mutso M, Utt A, Lepland A, Herrero LJ, Taylor A, *et al.* Decreased Virulence of Ross River Virus Harboring a Mutation in the First Cleavage Site of Nonstructural Polyprotein Is Caused by a Novel Mechanism Leading to Increased Production of Interferon-Inducing RNAs. *mBio.* 2018 Aug 21;9(4).
65. Kantor AM, Lin J, Wang A, Thompson DC, Franz AWE. Infection Pattern of Mayaro Virus in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) and Transmission Potential of the Virus in Mixed Infections With Chikungunya Virus. *J Med Entomol.* 2019 Apr 16;56(3):832–43.
66. Vogels CBF, Rückert C, Cavany SM, Perkins TA, Ebel GD, Grubaugh ND. Arbovirus coinfection and co-transmission: A neglected public health concern? *PLoS Biol.* 2019;17(1):e3000130.

67. LaBeaud AD, Banda T, Brichard J, Muchiri EM, Mungai PL, Mutuku FM, *et al.* High rates of o'nyong nyong and Chikungunya virus transmission in coastal Kenya. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Feb;9(2):e0003436.
68. Partidos CD, Paykel J, Weger J, Borland EM, Powers AM, Seymour R, *et al.* Cross-protective immunity against o'nyong-nyong virus afforded by a novel recombinant chikungunya vaccine. *Vaccine.* 2012 Jun 29;30(31):4638–43.
69. Gao Y, Goonawardane N, Ward J, Tuplin A, Harris M. Multiple roles of the non-structural protein 3 (nsP3) alphavirus unique domain (AUD) during Chikungunya virus genome replication and transcription. *PLoS Pathog.* 2019;15(1):e1007239.
70. Chen MW, Tan YB, Zheng J, Zhao Y, Lim BT, Cornvik T, *et al.* Chikungunya virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase core domain displays detergent-sensitive primer extension and terminal adenylyltransferase activities. *Antiviral Res.* 2017;143:38–47.
71. Panas MD, Ahola T, McInerney GM. The C-terminal repeat domains of nsP3 from the Old World alphaviruses bind directly to G3BP. *J Virol.* 2014 May;88(10):5888–93.
72. Fros JJ, Geertsema C, Zouache K, Baggen J, Domeradzka N, van Leeuwen DM, *et al.* Mosquito Rasputin interacts with chikungunya virus nsP3 and determines the infection rate in *Aedes albopictus*. *Parasit Vectors.* 2015;8:464.
73. Utt A, Das PK, Varjak M, Lulla V, Lulla A, Merits A. Mutations conferring a noncytotoxic phenotype on chikungunya virus replicons compromise enzymatic properties of nonstructural protein 2. *J Virol.* 2015 Mar;89(6):3145–62.
74. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul 1;31(13):3406–15.
75. Darty K, Denise A, Ponty Y. VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinforma Oxf Engl.* 2009 Aug 1;25(15):1974–5.

Figures

Figure 1

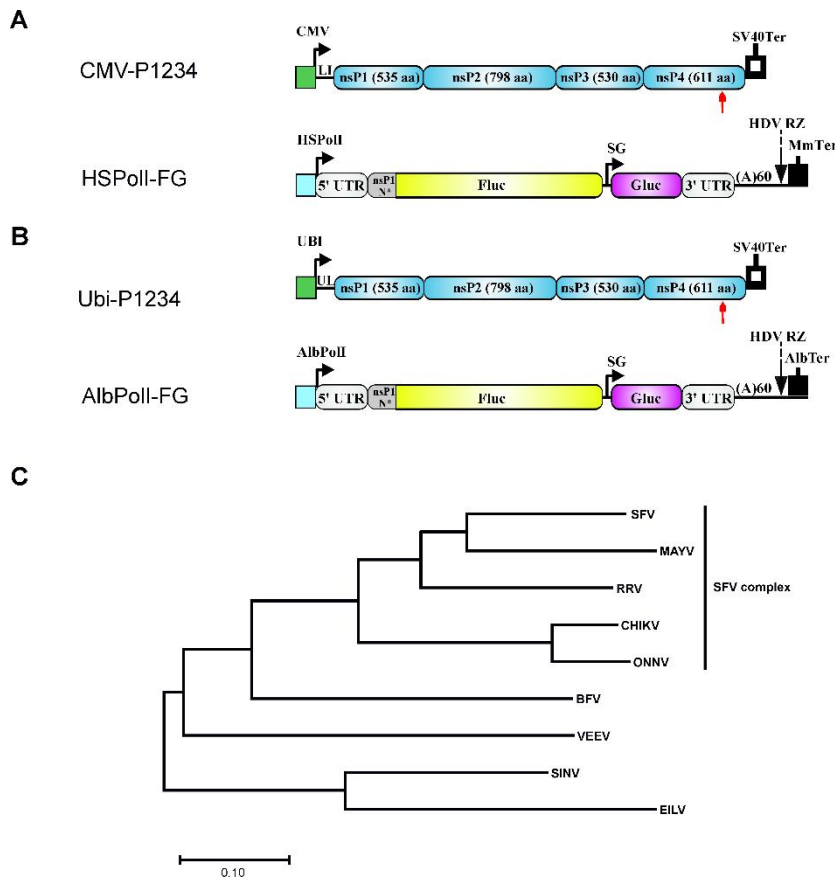


Fig 1. Alphaviruses selected for the analysis and designs of *trans*-replication tools. (A) Schematic representation of constructs for human cells. CMV, immediate early promoter of human cytomegalovirus; LI, leader sequence of the herpes simplex virus thymidine kinase gene with artificial intron; SV40Ter, simian virus 40 late polyadenylation region; HSPoll, a truncated promoter (residues -211 to -1) for human RNA polymerase I; MmTer, a terminator for RNA polymerase I in mice. (B). Schematic representation of constructs for *Aedes albopictus* cells. UBI, polyubiquitin promoter of *Aedes aegypti*; UL, leader sequence of *Aedes aegypti* polyubiquitin gene with a natural intron; AlbPoll – truncated promoter (residues -250 to -1) for *Aedes albopictus* RNA polymerase I; AlbTer – putative terminator for *Aedes albopictus* RNA polymerase I. (A, B) 5' UTR, full length 5' UTR of an alphavirus; 3' UTR, truncated (last 110 residues) 3' UTR of an alphavirus; SG - SG promoter spanning (with respect to termination codon of nsP4) from position -79 to the end of intergenic region, nsP1 N* - region encoding the N-terminal 77 to 114 amino acid residues of nsP1, depending on the virus; HDV RZ - antisense strand ribozyme of hepatitis delta virus. Red arrow indicates the location of the GDD motif in nsP4; in polymerase negative constructs this was replaced by GAA. The vector backbones are not shown and drawings are not to scale. (C) Phylogenetic tree of replicases of analysed alphaviruses. Phylogenetic tree was constructed using evolutionary analysis by Maximum Likelihood method and JTT matrix based model. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitution per site. This analysis involved sequences of P1234 of indicated viruses. Evolutionary analysis was conducted using MEGA-X software.

Figure 2

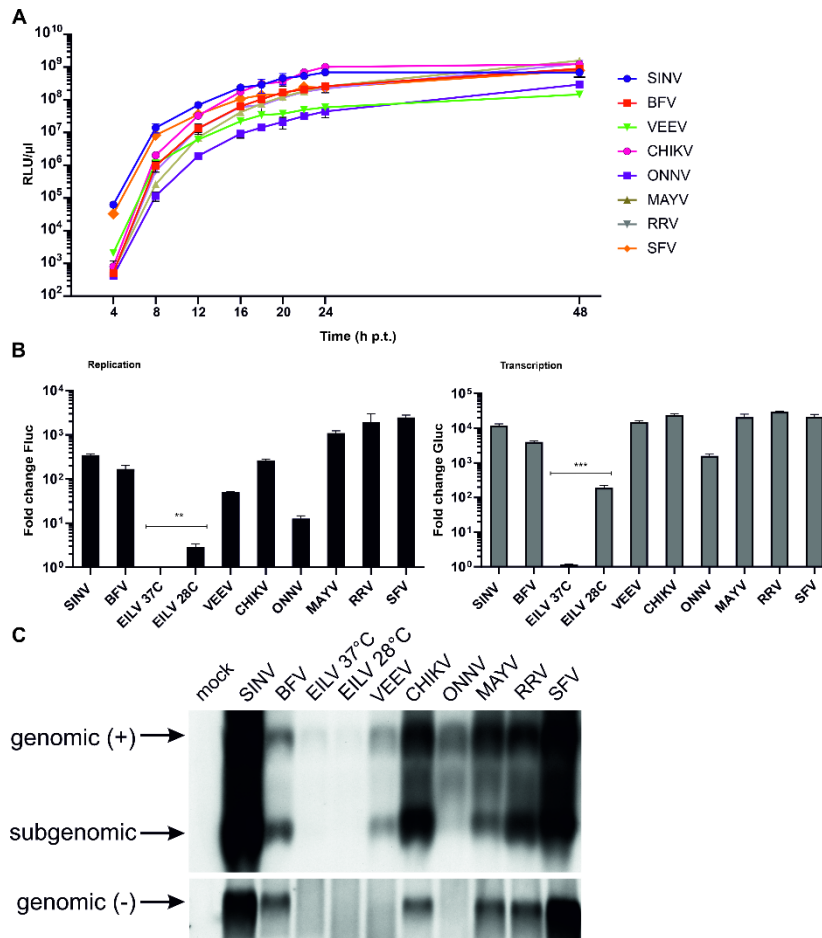


Fig 2. Alphavirus replicases can replicate and transcribe their templates in human cells. (A) HEK293T cells in 12-well plates were co-transfected with matching pairs of CMV-P1234 and HSPolII-FG plasmids. At 4, 8, 12, 16, 20, 22, 24 and 48 h p.t. growth media aliquots were collected the activity of secreted Gluc measured. Means of relative luminescence units (RLU) per 1 μl of sample + standard deviation (SD) of three independent experiments are shown. (B) HEK293T cells in 96-well plates were co-transfected with matching pairs of CMV-P1234 and HSPolII-FG plasmids and, as negative control, CMV-P1234^{GAA}, which lacks polymerase activity, instead of CMV-P1234. Cells were incubated at 37°C and lysed 18 h post transfection (p.t.); cells transfected with plasmids containing sequences from EILV were also incubated at 28°C and lysed 48 h p.t. Fluc (marker of replication, left panel) and Gluc (marker of transcription, right panel) activities produced by active replicases were normalized to the P1234^{GAA} controls. Value obtained for P1234^{GAA} controls was taken as 1; activities lower than that observed for P1234^{GAA} are also shown as 1. Means + SD of three independent experiments are shown; $p < 0.01^{**}$; $p < 0.001^{***}$ (Student's unpaired t-test). (C) HEK293T cells in 12-well plates were co-transfected and incubated as described for panel A; control cells were mock-transfected. Total RNA was extracted and analysed by northern blotting. Full-length “genomic” template RNA of positive (+) and negative (-) polarity and subgenomic RNA are indicated. Note that transcripts made by human RNA polymerase I using HSPolII-FG plasmids as templates co-migrate with replicase-generated positive-strand genomic RNA and are detected by the same probe. The experiment was repeated twice with similar results; data from one experiment is shown.

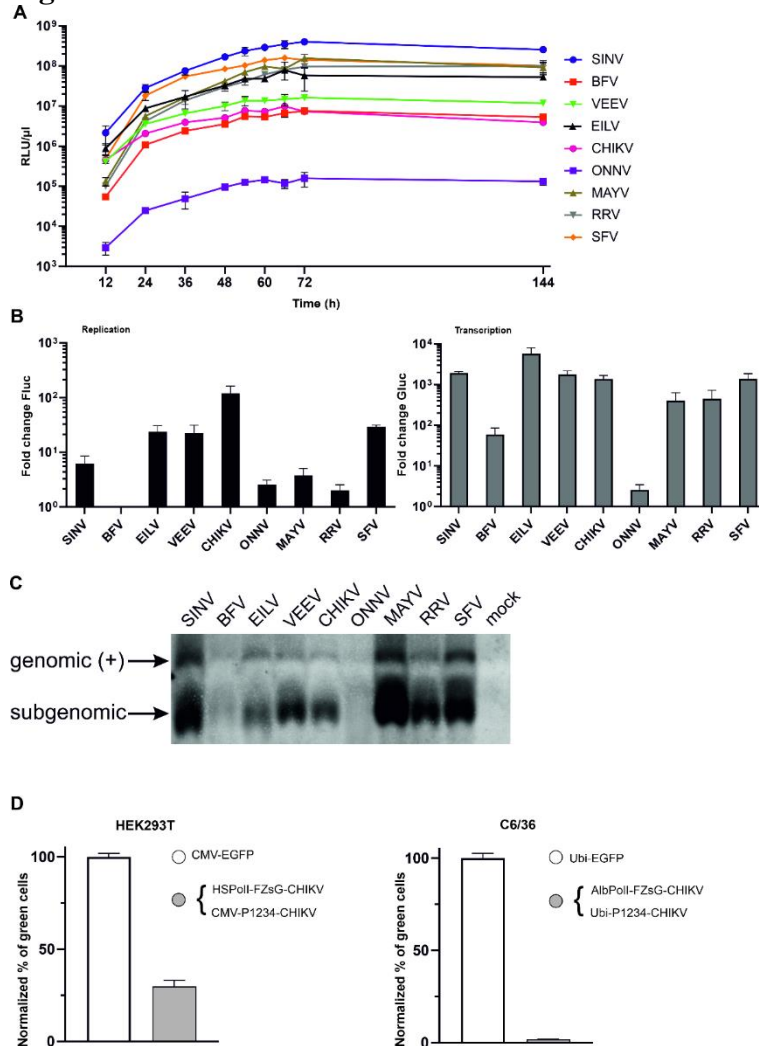
Figure 3

Fig 3. Alphavirus replicases can replicate and transcribe their templates in *Aedes albopictus* cells. (A) C6/36 cells in 12-well plates were co-transfected with matching pairs of Ubi-P1234 and AlbPoll-FG plasmids. At 12, 24, 36, 48, 54, 66, 72 and 144 h p.t. growth media aliquots were collected the activity of secreted Gluc measured. Means of relative luminescence units (RLU) per 1 μl of sample + SD of three independent experiments are shown. (B) C6/36 cells in 96-well plates were co-transfected with matching pairs of AlbPoll-FG and either Ubi-P1234 or Ubi-P1234^{GAA} plasmids. Cells were incubated at 28°C and lysed 48 h p.t. The Fluc (left panel) and Gluc (right panel) activities produced by P1234 replicases were normalized to the polymerase-defective P1234^{GAA} controls as described for Fig 2. Means + SD of three independent experiments are shown. (C) C6/36 cells in 12-well plates were co-transfected as described for panel A. Total RNA was extracted and positive strand RNAs were detected using northern blotting. “Genomic” indicates the full-length template RNA. Note that transcripts made by mosquito RNA polymerase I using AlbPoll-FG plasmids as template co-migrate with replicase-generated positive-strand genomic RNAs. “Subgenomic” indicates the SG RNAs synthesized by replicases using the SG promoter. The experiment was repeated twice with similar results; data from one experiment is shown. (D) HEK293T cells (left panel) were co-transfected with HSPoll-FZsG-CHIKV and CMV-P1234-CHIKV; C6/36 cells (right panel) were co-transfected with AlbPoll-FZsG-CHIKV and Ubi-P1234-CHIKV. Control cells were transfected with plasmid expressing EGFP from a CMV promoter (HEK293T) or from a polyubiquitin promoter (C6/36). At 18 h (HEK293T) or 48 h (C6/36) p.t. cells were collected and analyzed with an Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer. The number of ZsGreen-expressing cells is shown as a proportion of the number of EGFP expressing cells, to control

for the different transfection efficiency of the two cell types. All transfections were performed in triplicate, means + SD are shown.

Figure 4

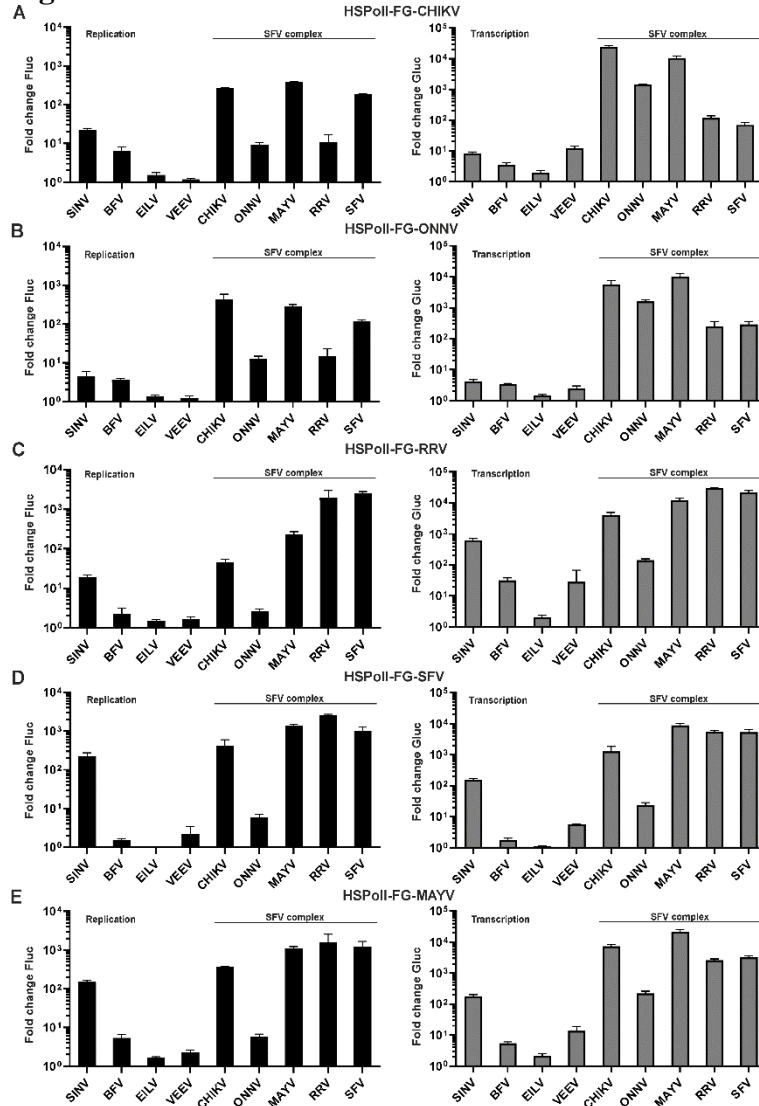


Fig 4. Cross-utilization of templates of viruses belonging to the SFV complex in human cells. HEK293T cells were co-transfected with combinations of each CMV-P1234 replicase expression plasmid or corresponding CMV-P1234^{GAA} control and (A) HSPoII-FG-CHIKV, (B) HSPoII-FG-ONNV, (C) HSPoII-FG-RRV, (D) HSPoII-FG-SFV or (E) HSPoII-FG-MAYV. Transfected cells were incubated at 37°C and lysed 18 h p.t.; cells transfected with plasmids originating from EILV were incubated at 28°C and lysed 48 h p.t. Data represent the luciferase activity (Fluc and Gluc) from CMV-P1234 transfected cells normalized to the paired CMV-P1234^{GAA} control cells. Value obtained for P1234^{GAA} controls was taken as 1; activities lower than that observed for P1234^{GAA} are also shown as 1. X-axis represents different replicases, means + SD are from three independent experiments.

Figure 5

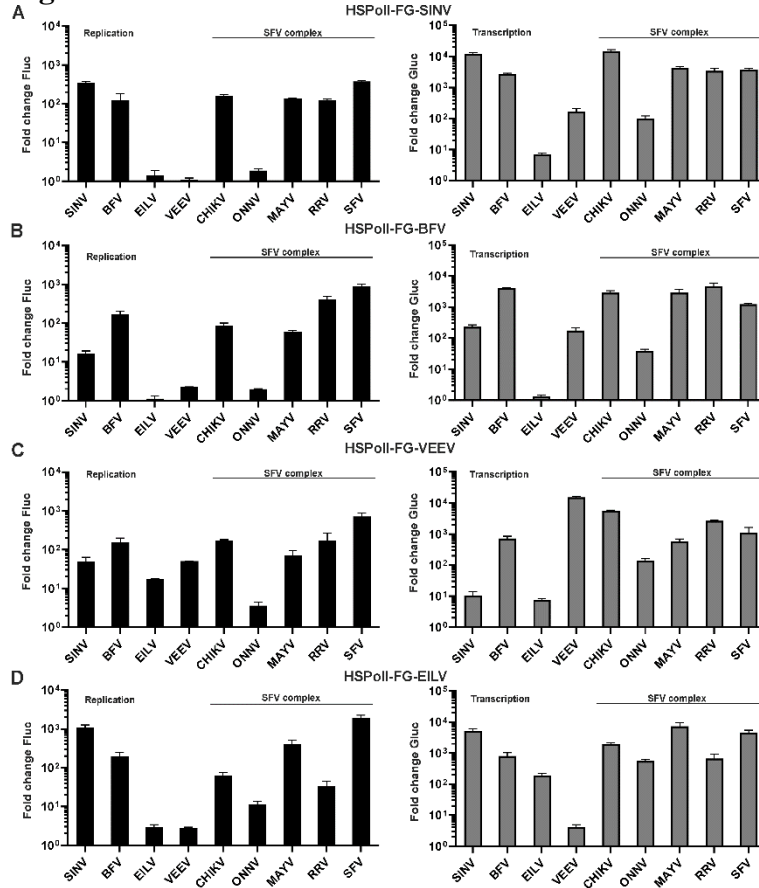


Fig 5. Cross-utilization of templates of outgroup alphaviruses in human cells. HEK293T cells were co-transfected with combinations of each CMV-P1234 replicase expression plasmid or corresponding CMV-P1234^{GAA} control and (A) HSPolI-FG-SINV, (B) HSPolI-FG-BFV, (C) HSPolI-FG-VEEV or (D) HSPolI-FG-EILV. Transfected cells were incubated at 37°C and lysed 18 h p.t.; cells transfected with plasmids originating from EILV were incubated at 28°C and lysed 48 h p.t. Data represent the luciferase activity (Fluc and Gluc) from CMV-P1234 transfected cells normalized to the paired CMV-P1234^{GAA} control cells. Value obtained for P1234^{GAA} controls was taken as 1; activities lower than that observed for P1234^{GAA} are also shown as 1. X-axis represents different replicases, means + SD are from three independent experiments.

Figure 6

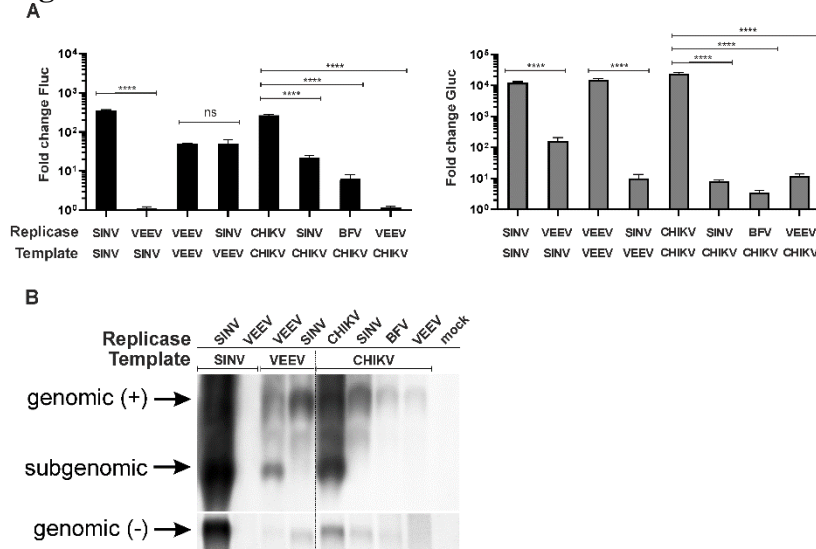


Fig 6. Incompatible combinations of alphavirus replicases and templates have defects in synthesis of viral RNAs. (A) HEK293T cells were co-transfected with combinations of HSPolII-FG template and CMV-P1234 replicase expression plasmids as indicated; in control cells CMV-P1234 was replaced with CMV-P1234^{GAA}. Cells were lysed 18 h p.t. Data represent the luciferase activity (Fluc and Gluc) from CMV-P1234 transfected cells normalized to the paired CMV-P1234^{GAA} control cells. Data is replotted from Fig 4 and Fig 5. Means + SD are from three independent experiments; ns, not significant, ****p<0.0001 (Student's unpaired t-test). (B) HEK293T cells were co-transfected with combinations of CMV-P1234 and HSPolII-FG plasmids as indicated. At 18 h p.t. cells were lysed and total RNAs were isolated. RNAs were analysed by northern blot as described for Fig 2B. The experiment was repeated twice with similar results; data from one experiment is shown.

Figure 7

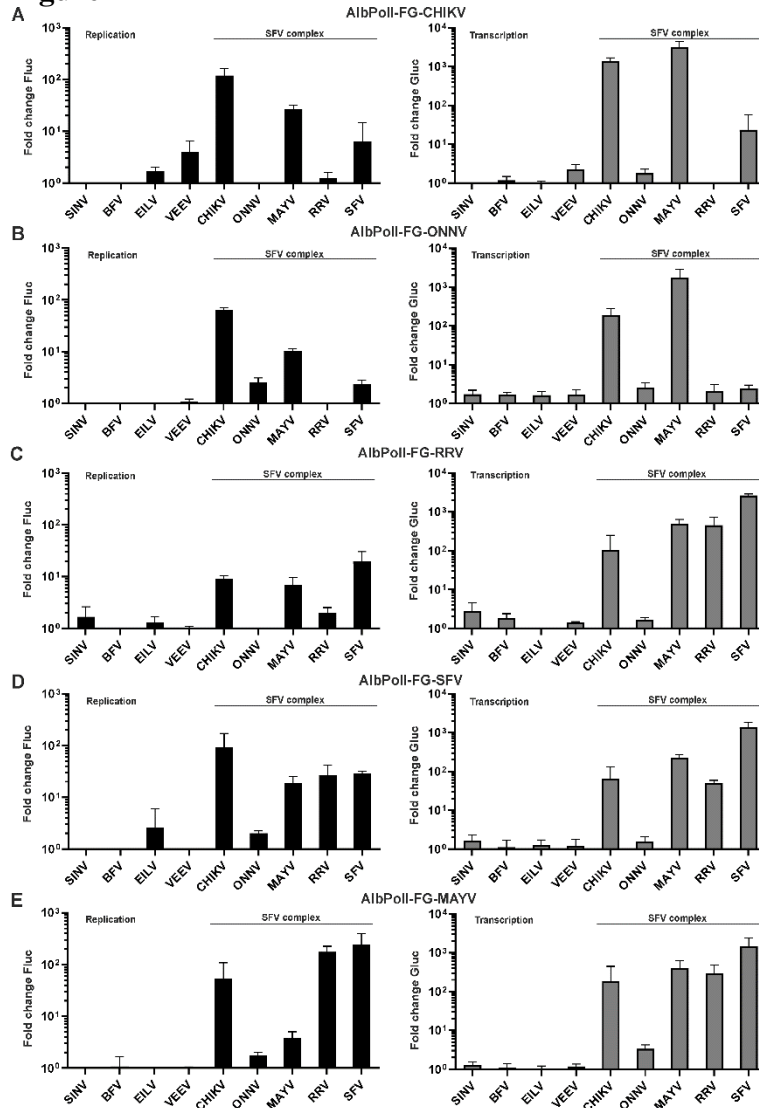


Fig 7. Cross-utilization of templates of viruses belonging to the SFV complex in *Aedes albopictus* C6/36 cells. C6/36 cells were co-transfected with combinations of each Ubi-P1234 replicase expression plasmid or corresponding Ubi-P1234^{GAA} control and (A) AlbPolII-FG-CHIKV, (B) AlbPolII-FG-ONNV, (C) AlbPolII-FG-RRV, (D) AlbPolII-FG-SFV or (E) AlbPolII-FG-MAYV. Transfected cells were incubated at 28°C and lysed 48 h p.t. Data represent the luciferase activity (Fluc and Gluc) from Ubi-P1234 transfected cells normalized to the paired Ubi-P1234^{GAA} control cells. Value obtained for P1234^{GAA} controls was taken as 1; activities lower than that observed for P1234^{GAA} are also shown as 1. X-axis represents different replicases, means + SD from three independent experiments are shown.

Figure 8

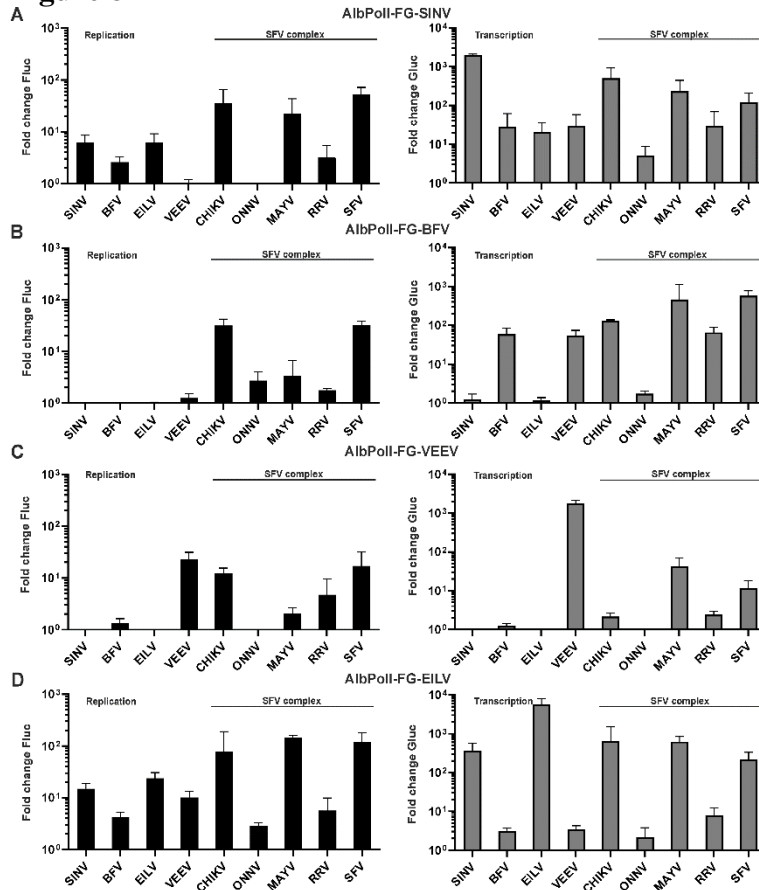


Fig 8. Cross-utilization of templates of outgroup alphaviruses in *Aedes albopictus* C6/36 cells. C6/36 cells were co-transfected with combinations of each Ubi-P1234 replicase expression plasmid or corresponding Ubi-P1234^{GAA} control and (A) AlbPolII-FG-SINV, (B) AlbPolII-FG-BFV, (C) AlbPolII-FG-VEEV or (D) AlbPolII-FG-EILV. Transfected cells were incubated at 28°C and lysed 48 h p.t. Data represent the luciferase activity (Fluc and Gluc) from Ubi-P1234 transfected cells normalized to the paired Ubi-P1234^{GAA} control cells. Value obtained for P1234^{GAA} controls was taken as 1; activities lower than that observed for P1234^{GAA} are also shown as 1. X-axis represents different replicases, means + SD from three independent experiments are shown.

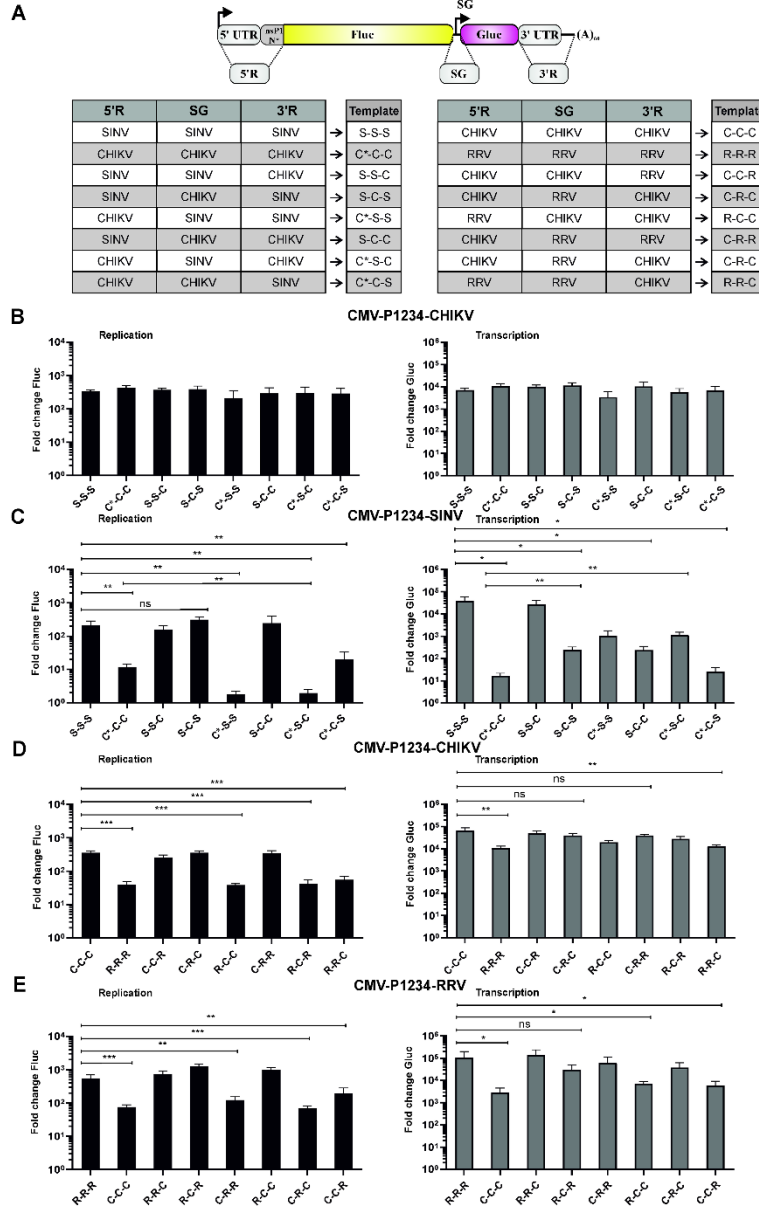
Figure 9

Fig 9. Specificity for the replicase resides in the 5'- and SG regions of the template RNA. (A) Schematic representation and explanation of names of SIN, CHIKV and RRV swapped template RNAs. 5'R - 5' region; 3'R - 3' region, C* - 5' region of CHIKV template containing 336nt from nsP1 encoding region; C - 5' region of CHIKV template containing 231nt from nsP1 encoding region. Other elements are the same as on Fig 1A. (B-E) U2OS cells grown in 12-well plate were co-transfected with plasmids encoding for indicated template RNAs and with (B, D) CMV-P1234-CHIKV, (C) CMV-P1234-SIN or (E) CMV-P1234-RRV. For control cells the plasmid expressing active replicase was substituted with corresponding CMV-P1234^{GAA} plasmid. Cells were lysed 18 h p.t. Data represent the luciferase activity (Fluc and Gluc) from CMV-P1234 transfected cells normalized to the paired CMV-P1234^{GAA} control cells. Means + SD are from three (B, C, D) or four (E) independent experiments are shown; ns, not significant, *p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 (Student's unpaired t-test).

Figure 10

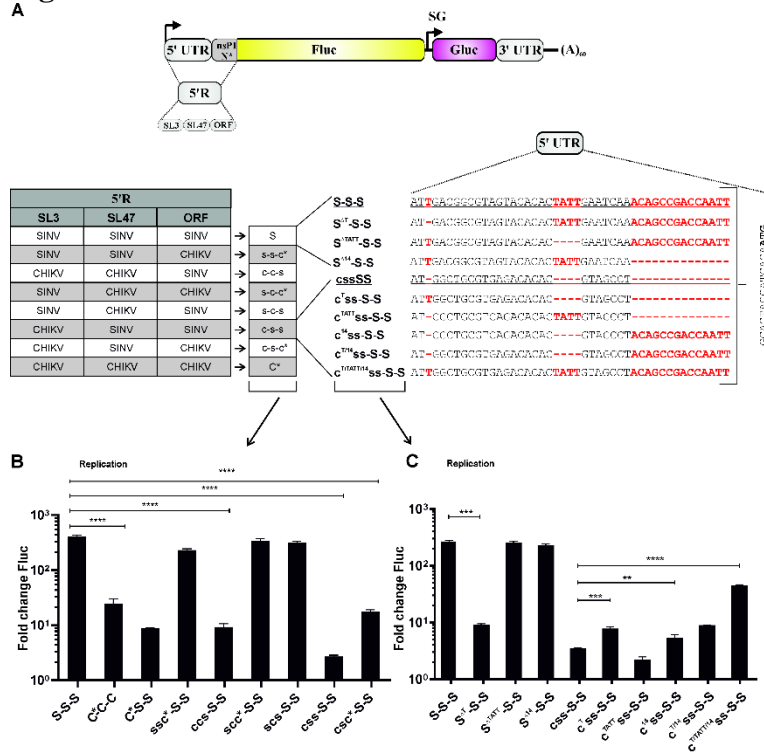
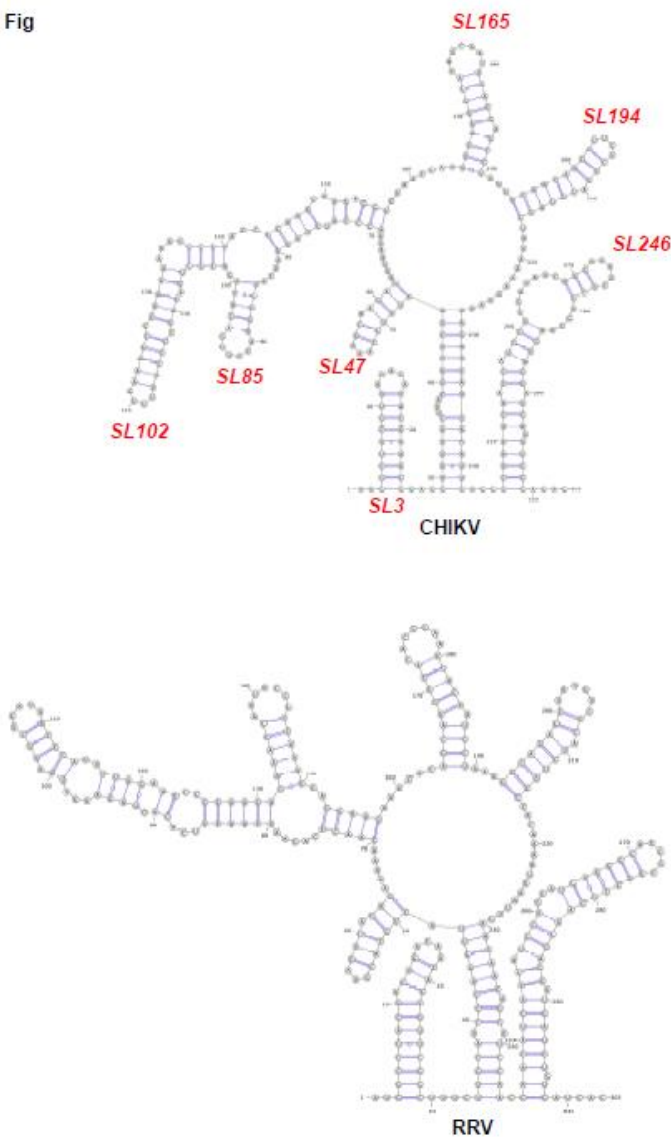
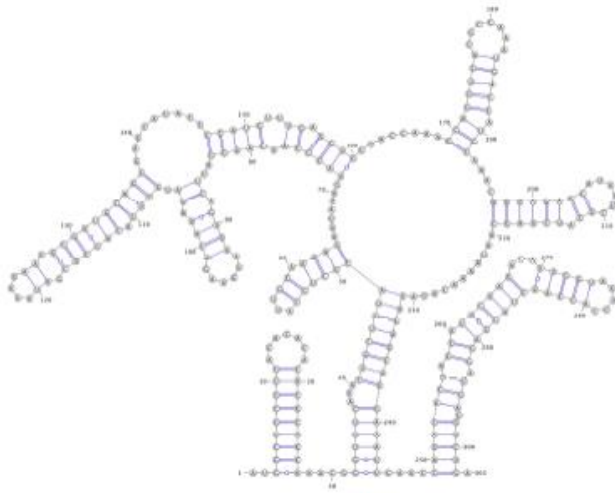


Fig 10. Determinants located at the 5' end of the template RNA are crucial for SINV replicase. (A). Schematic representation of template RNAs. Changes introduced into the 5' region of S-S-S template RNA are shown on left panel. Right panel shows 5' UTR sequences of modified S-S-S and css-S-S templates. SL structures in CHIKV sequence are designated SL3 and SL47 according to (33). Other elements and designations are the same as Figs 1A and 9A. (B). U2OS cells grown in 12-well plate were co-transfected with CMV-P1234-SINV and HSPoII-FG-SSS, HSPoII-FG-C*CC, HSPoII-FG-C*SS or derivatives of HSPoII-FG-SSS expressing templates containing indicated swaps in their 5' region. For transfection of control cells CMV-P1234^{GAA}-SINV and HSPoII-FG-SSS were used. (C) U2OS cells grown on 12-well plate were co-transfected with CMV-P1234-SINV and HSPoII-FG-SSS, HSPoII-FG-cssSS or their derivatives expressing templates containing indicated mutations in the SL3 and/or in extreme 5' end of the template. For transfection of control cells CMV-P1234^{GAA}-SINV was used instead of CMV-P1234-SINV. Cells were lysed 18 h p.t. Fluc activities produced by active replicases were normalized to those measured in control cells. Means + SD of three independent experiments are shown; ** p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001(Student's unpaired t-test).

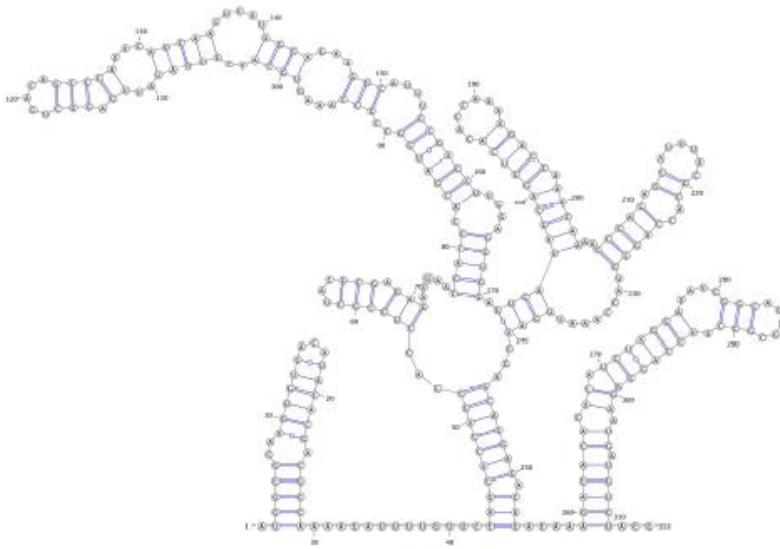
Supporting information

S1 Fig

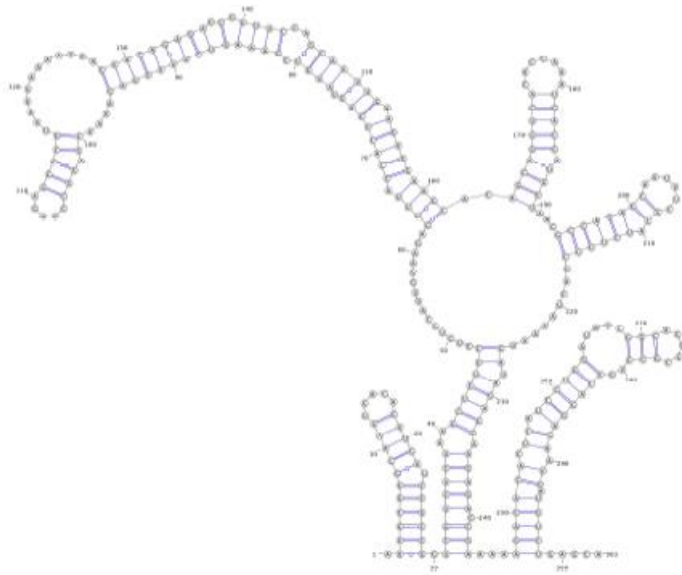




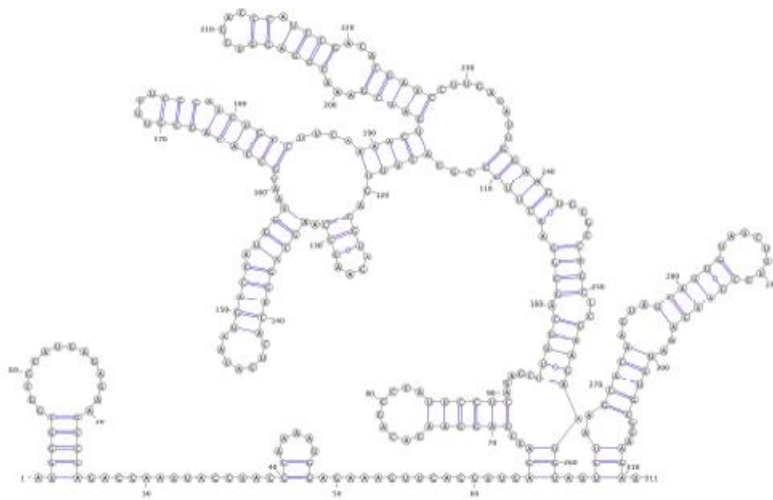
ONNV



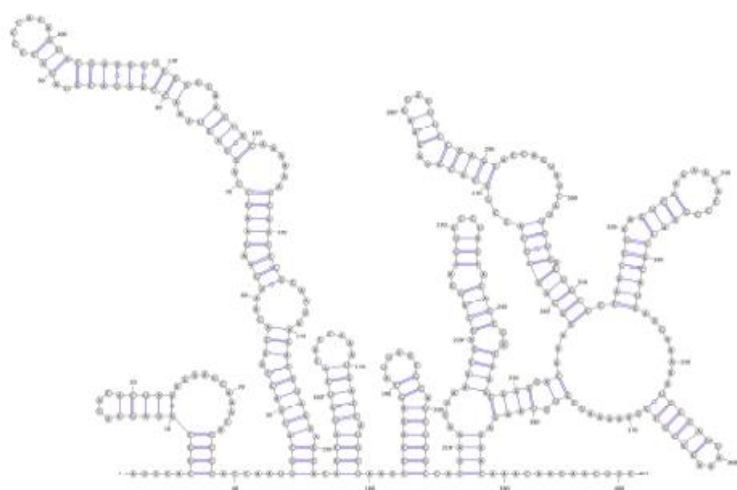
SFV



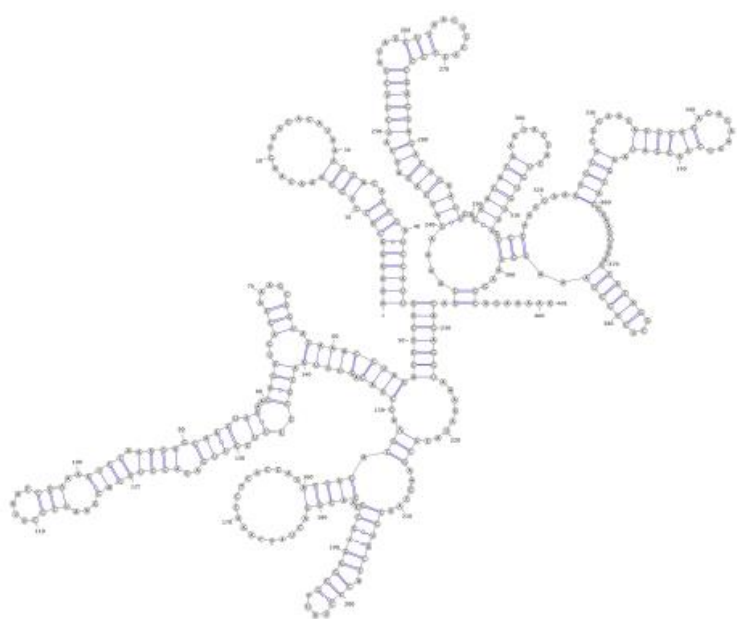
MAYV



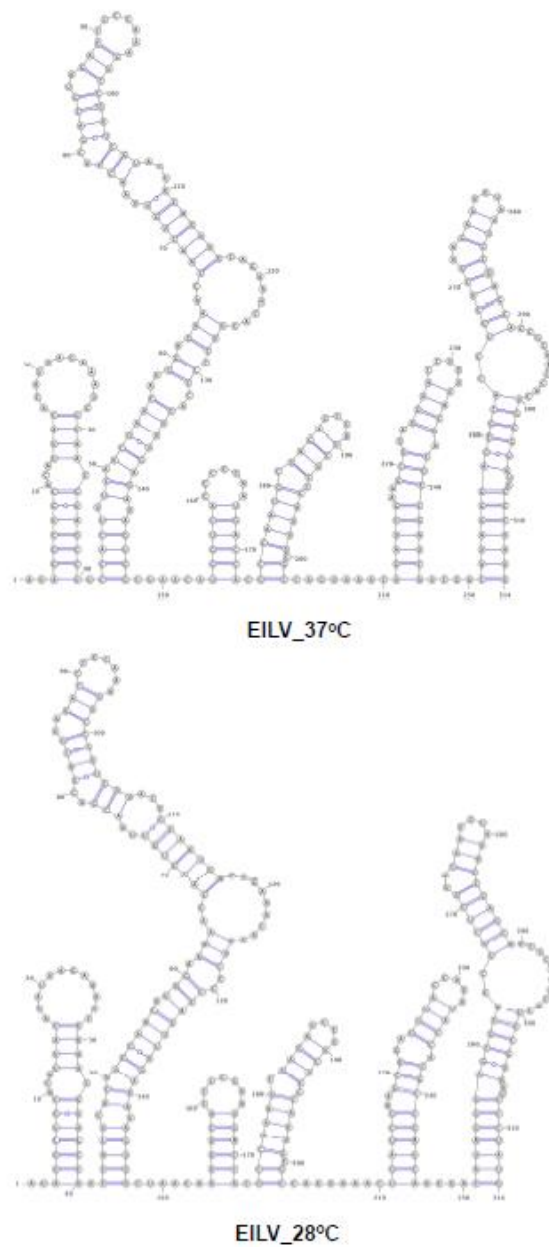
VEEV



SINV

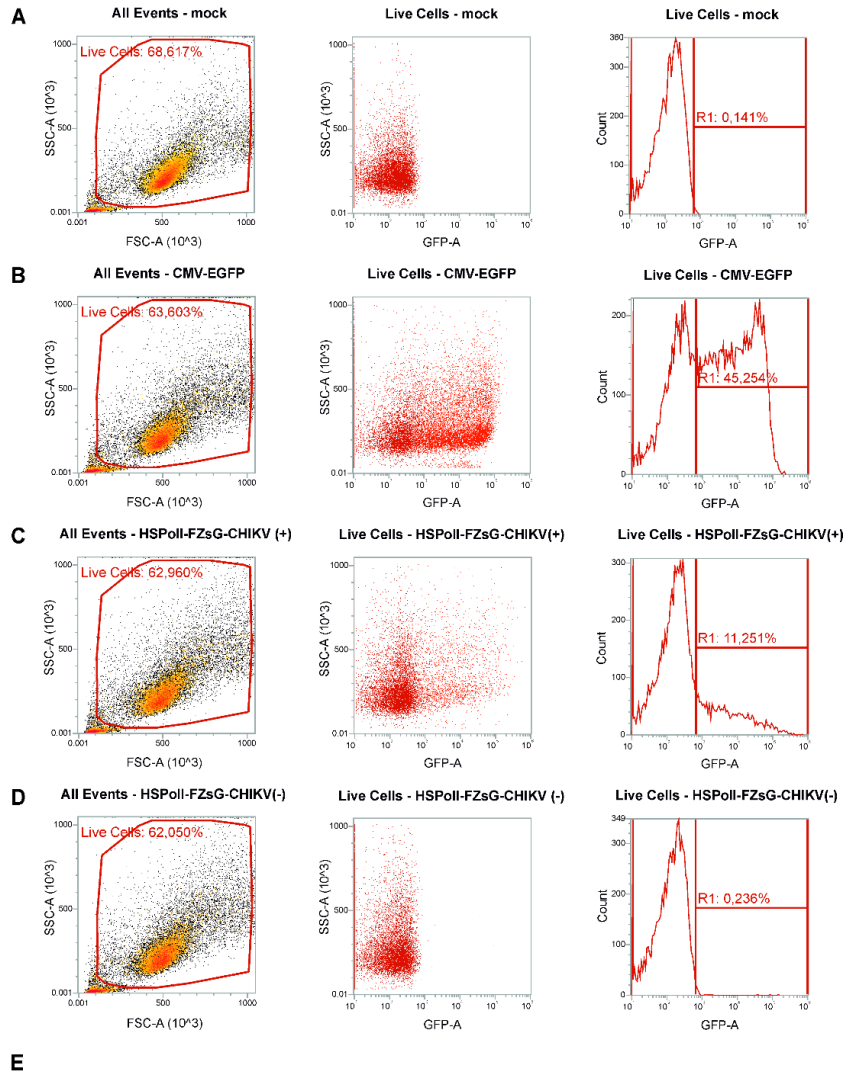


BFV



S1 Fig. Comparative RNA folding predictions for 9 alphaviruses used in the study. *In silico* predicted UNAFOLD thermodynamic predictions for stable RNA structures within the 5' UTR and adjacent ORF1 encoding region for of CHIKV, SINV and a range of divergent alphaviruses.

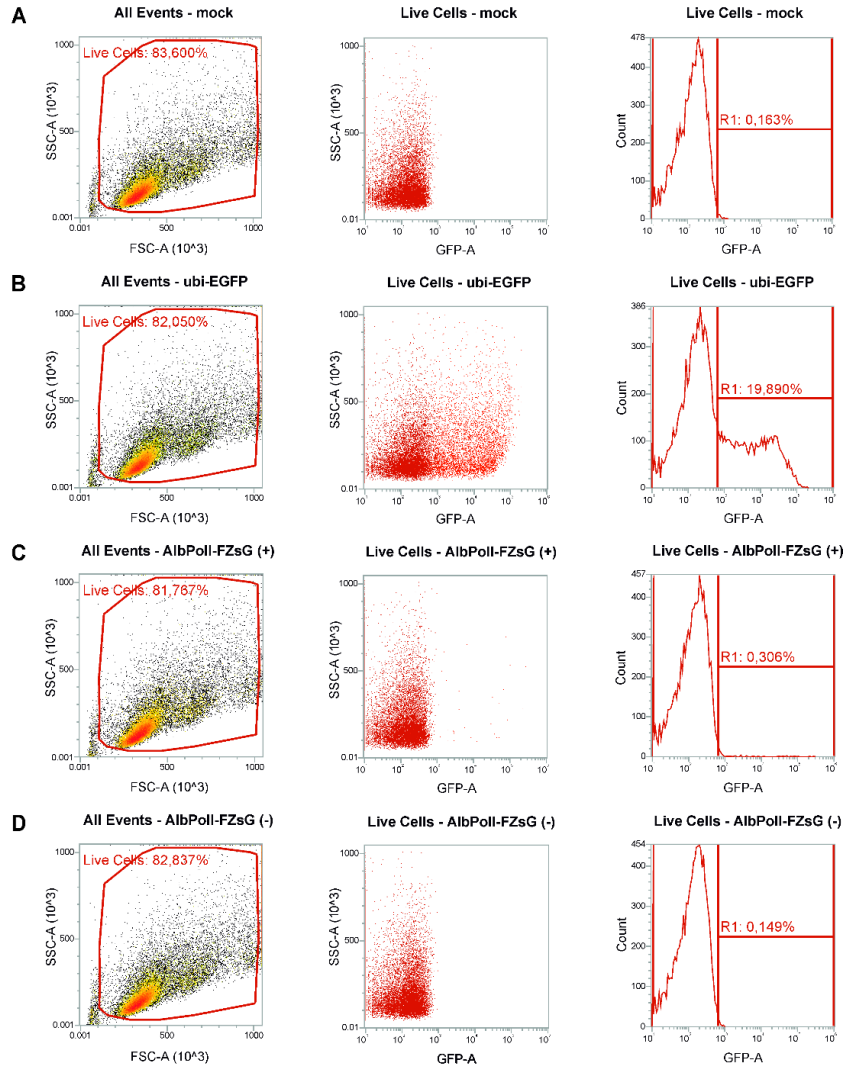
S2 Fig



HEK293T	Live count	R1 count	% R1/live	X mean R1
Mock	20141 ± 416	41 ± 11	0,2 ± 0,06	756 ± 20
CMV-EGFP	19317 ± 414	8370 ± 236	43 ± 1,85	19769 ± 473
HSPoll-FZsG (+)	18869 ± 270	2066 ± 57	12 ± 3	21179 ± 1247
HSPoll-FZsG (-)	19208 ± 543	40 ± 5	0,2 ± 0,03	2886 ± 3141

S2 Fig. Efficiency of CHIKV *trans*-replication in HEK293T cells. HEK293T cells were mock-transfected (A), transfected with CMV-EGFP plasmid (B), co-transfected with HSPoll-FZsG-CHIKV and CMV-P1234-CHIKV (C) or co-transfected with HSPoll-FZsG-CHIKV and CMV-P1234^{GAA}-CHIKV (D). At 18 h p.t. cells were collected and analyzed with an Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer. For each panel one image out of three showing flow blot of living cells (left), flow blot of EGFP/ZsGreen fluorescence in live cells (middle) and the gating used (right) are shown. (E) Combined data from three experiments showing live cells count, EGFP/ZsGreen positive cells count, the percentage of EGFP/ZsGreen positive cells from live cells and a fluorescence intensity in EGFP/ZsGreen positive cells (R1 mean). Data are presented as mean +SD.

S3 Fig

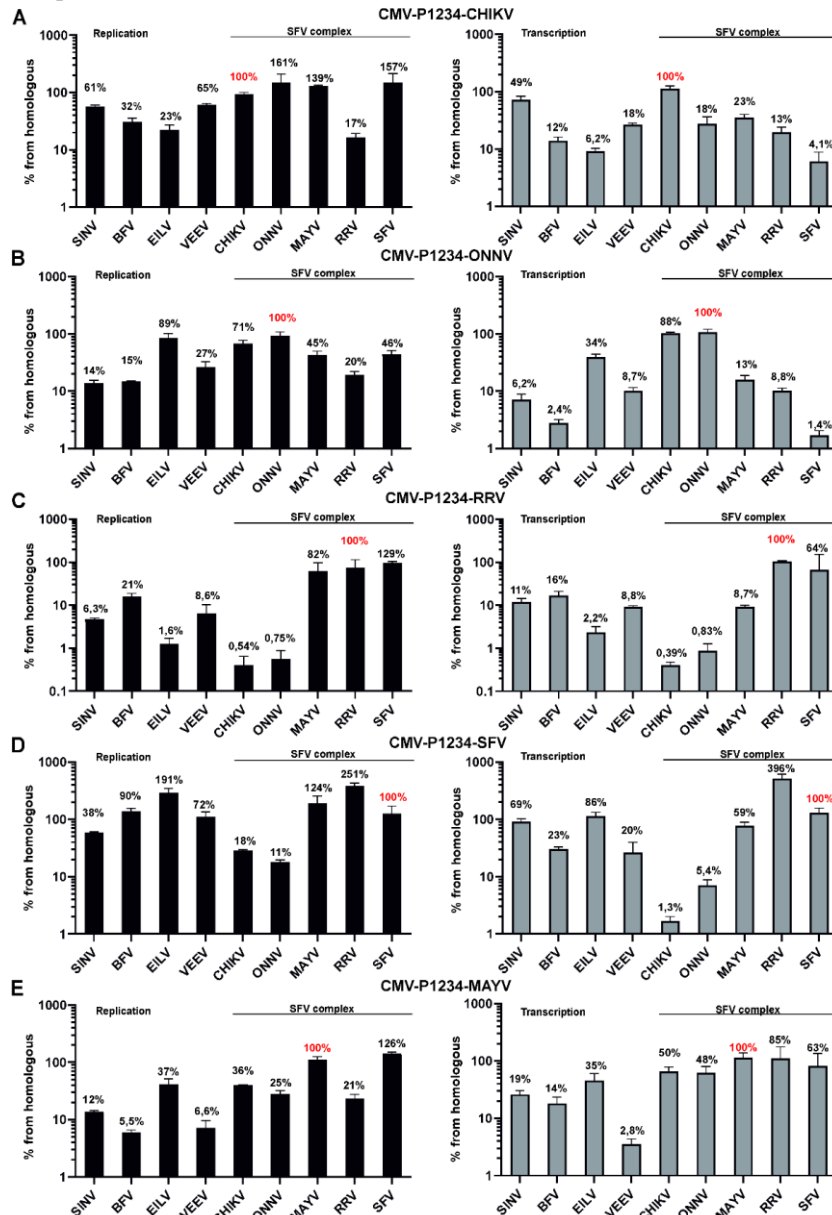


E

C6/36	Live count	R1 count	% R1/live	X mean R1
Mock	24891 ± 217	43 ± 4	0,2 ± 0,01	763 ± 20
Ubi-EGFP	24603 ± 280	5212 ± 562	21 ± 2	14604 ± 2017
AlbPoll-FZsG (+)	24302 ± 207	96 ± 27	0,4 ± 0,1	20188 ± 5231
AlbPoll-FZsG (-)	24731 ± 106	39 ± 5	0,2 ± 0,02	765 ± 21

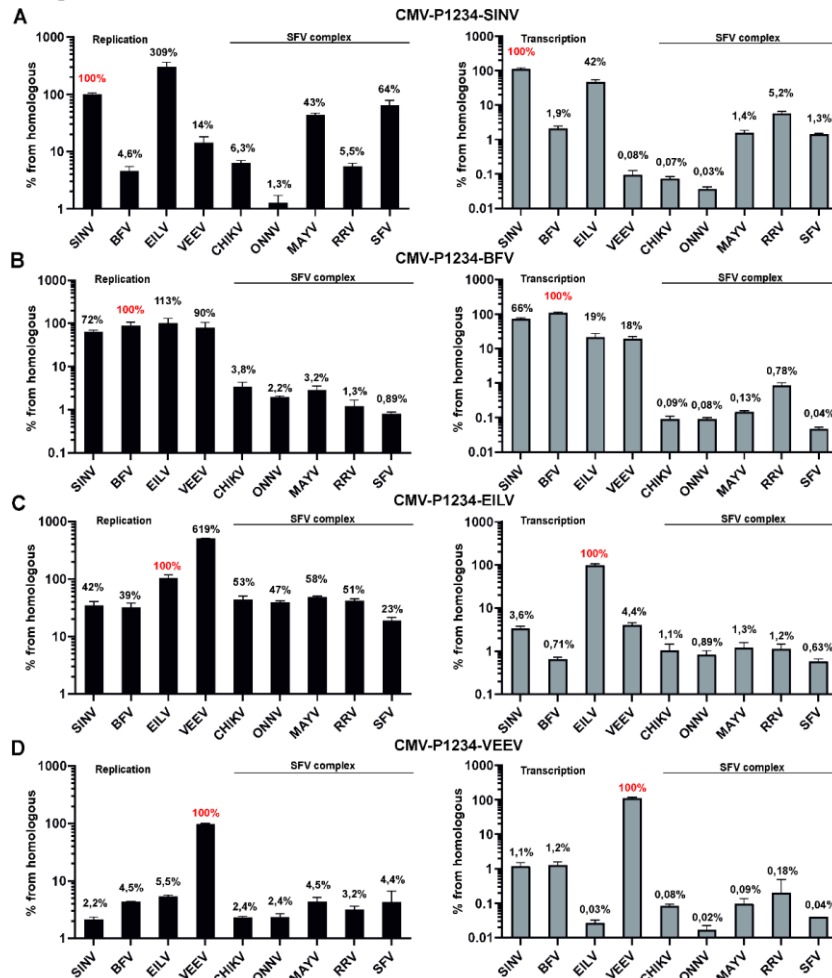
S3 Fig. Efficiency of CHIKV *trans*-replication in C6/36 cells. C6/36 cells were mock-transfected (A), transfected with Ubi-EGFP plasmid (B), co-transfected with AlbPoll-FZsG-CHIKV and Ubi-P1234-CHIKV (C) or co-transfected with AlbPoll-FZsG-CHIKV and Ubi-P1234^{GAA}-CHIKV (D). At 48 h p.t. cells were collected and analyzed with an Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer. Data are presented as described for S2 Fig.

S4 Fig



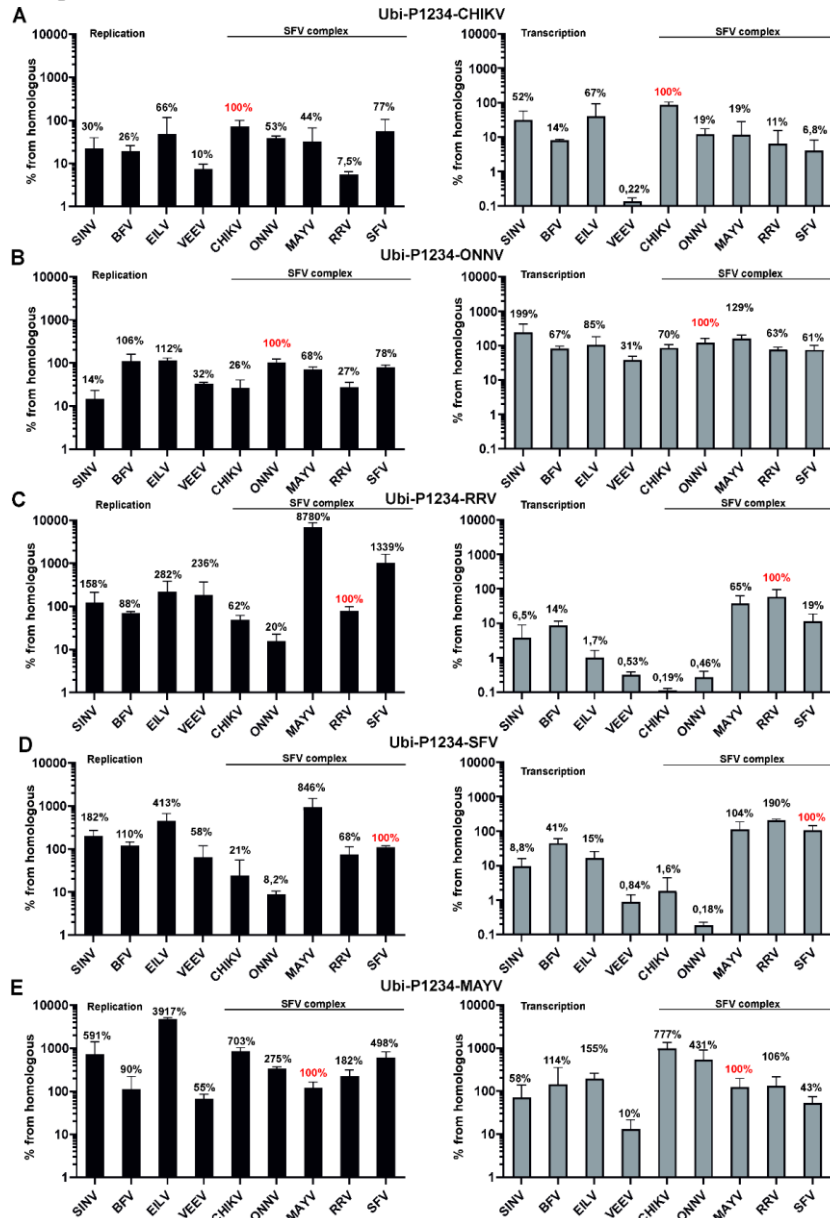
S4 Fig. Comparison of capacities of replicases from SFV complex to replicate (left) and transcribe (right) different template RNAs in human cells. Data is replotted from Fig 4 and 5. X-axis shows different templates; Y-axis shows percentage of activity of replicase on different templates; the activity on homologous template is taken as 100%.

S5 Fig



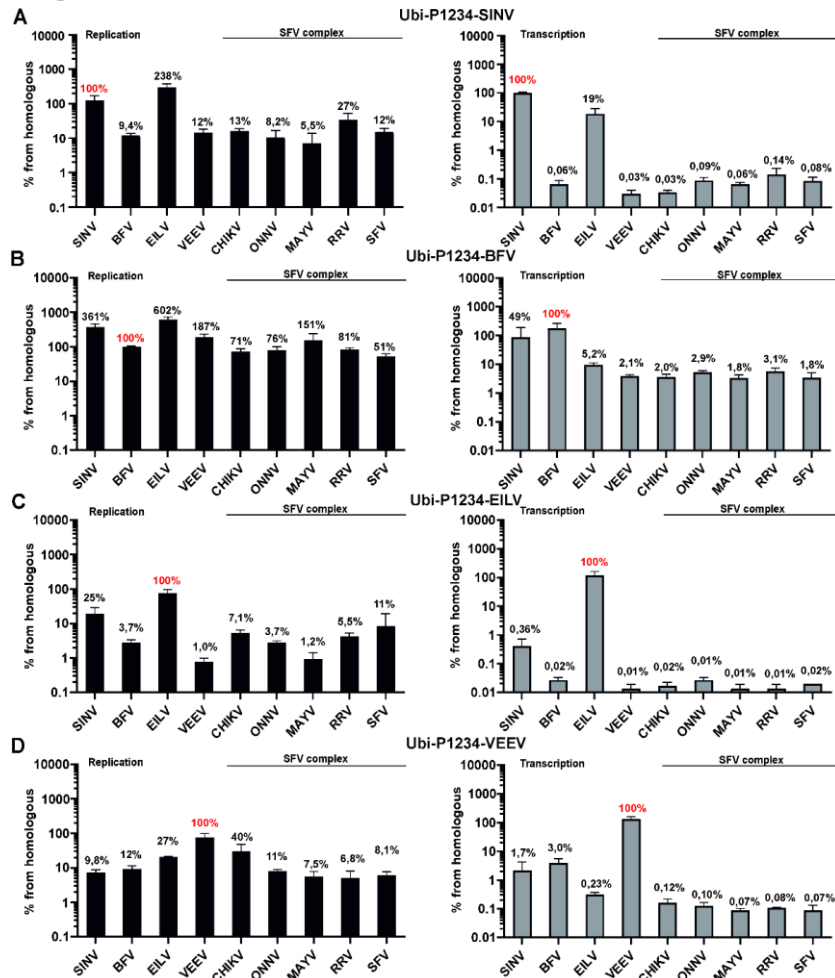
S5 Fig. Comparison of capacities of replicases from outgroup alphaviruses to replicate (left) and transcribe (right) different template RNAs in human cells. Data is replotted from Fig 4 and 5. X-axis shows different templates; Y-axis shows percentage of activity of replicase on different templates; the activity on homologous template is taken as 100%.

S6 Fig



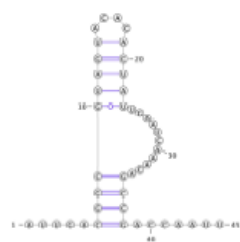
S6 Fig. Comparison of capacities of replicases from SFV complex to replicate (left) and transcribe (right) different template RNAs in *Aedes albopictus* C6/36 cells. Data is replotted from Fig 7 and 8. X-axis shows different templates; Y-axis shows percentage of activity of replicase on different templates; the activity on homologous template is taken as 100%.

S7 Fig

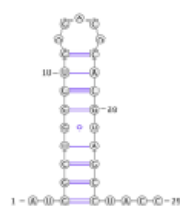


S7 Fig. Comparison of capacities of replicases from outgroup alphaviruses to replicate (left) and transcribe (right) different template RNAs in *Aedes albopictus* C6/36 cells. Data is replotted from Fig 7 and 8. X-axis shows different templates; Y-axis shows percentage of activity of replicase on different templates; the activity on homologous template is taken as 100%.

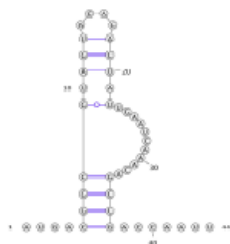
S8 Fig



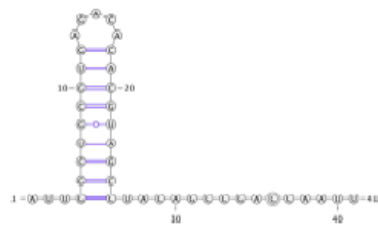
SINV (S-S-S)
- 28.9 kJ/mol



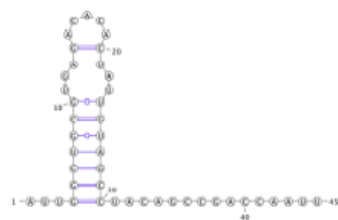
CHIKV (C-C-C)
- 65.7 kJ/mol



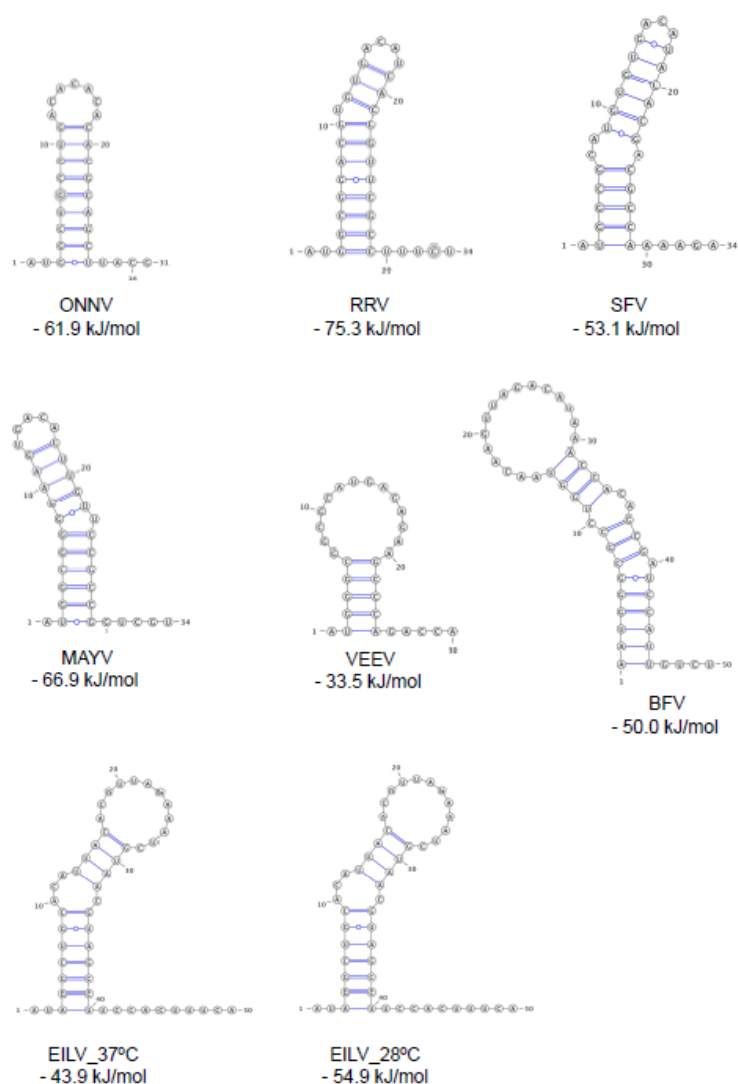
S Δ T-S-S
- 28.9 kJ/mol



c^{T/14}ss-S-S
- 65.7 kJ/mol



c^{T/TATT/14}ss-S-S
- 42.3 kJ/mol



S8 Fig. Comparative RNA folding predictions for SL3 region of SINV, CHIKV, mutant recombinant constructs and other alphaviruses used in the study. *In silico* predicted UNAFOLD thermodynamic predictions for stable RNA structures within the SL3 region of SINV (S-S-S), CHIKV (C-C-C), S^{ΔT}-S-S, c^{T/14}_{ss}-S-S, c^{T/TATT}_{ss}-S-S and a range of divergent alphaviruses.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Laura Sandra Lello

(sünnikuupäev: 26.07.1996)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Alfaviiruste RNA sünteesiks vajalike determinantide uurimine matriits-RNAde ja replikaaside kombinatsioonide abil,

mille juhendajad on Age Utt ja Andres Merits,

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Tartus, 06.08.20